

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik Großhadern  
der LMU München  
(Direktor: Prof. Dr. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson)

**Vergleich zweier trägerfreier Kultursysteme bei der  
chondrogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen**

**Dissertation**  
**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**  
**an der Medizinischen Fakultät der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Irina Tebenkova**

**aus Ushga**

**2011**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Prof. Dr. med. Peter Müller

Berichterstatter:

-----

-----

-----

Priv. Doz. Dr. med. Peter Neth

Mitberichterstatter:

-----

-----

-----

Dr. med. Susanne Wagner-Mayer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

-----

-----

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

-----

07.07.2011

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller für die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Campus Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität, durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Susanne Wagner-Mayer für die exzellente Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei

Frau Dr. rer. nat. Birte Sievers für die Unterstützung und Ratschläge,

Frau Bärbel Schmitt und Frau Julia Redeker, medizinisch technischen Assistentinnen für die Unterstützung bei der Durchführung von Zellkulturen, von Anfertigungen der Färbungen und von Real-Time PCR,

Herrn Lars Schliack, Zuständigen für EDV, für die Unterstützung und für die Erstellung der graphischen Abbildungen,

meiner Mutter für die Unterstützung,

Der Gesellschaft Arthrose-Hilfe für die Statistik-Informationen.

**Inhaltsverzeichnis**

I	Einleitung	Seite 1
1.	Zielsetzung der Arbeit	Seite 1
2.	Knorpelarten	Seite 2
2.1	Molekularer Aufbau der ECM	Seite 2
2.2	Histologischer Aufbau des Gelenkknorpels	Seite 4
2.3	Hyaliner Gelenkknorpel – ein bradytrophes Gewebe	Seite 5
3.	Relevante Ursachen von Knorpeldefekten	Seite 6
4.	Therapien von Knorpeldefekten	Seite 7
4.1	Operative Therapieformen	Seite 7
4.2	Tissue Engineering	Seite 7
5.	Chondrogenese <i>in vivo</i>	Seite 9
5.1	Knorpelentstehung und Gelenkbildung	Seite 9
5.2	Entwicklungsstufen der Chondrogenese	Seite 11
5.3	Regulation der Chondrogenese	Seite 13
6.	Verwendung autologer Chondrozyten zur Behebung von Knorpeldefekten	Seite 15
7.	Verwendung mesenchymaler Stammzellen zur Behebung von Knorpeldefekten	Seite 15
7.1	Gewinnung von MSCs	Seite 16
7.2	Anwendungen mesenchymaler Stammzellen	Seite 17
7.3	Differenzierungen von MSCs <i>in vitro</i> in 3D-Trägerstrukturen	Seite 18
7.4	Differenzierungen von MSCs <i>in vitro</i> in trägerfreien hochdichten 3D-Zellkulturen	Seite 19

8.	Techniken trägerfreier hochdichter 3D-Zellkulturen	Seite 20
8.1	Technik der Pellet-Kultur	Seite 20
8.2	Technik der Membran-Kultur	Seite 21
II	Material und Methoden	Seite 23
1.	Zellkultur	Seite 23
1.1	Humane mesenchymale Stammzellen	Seite 23
1.2	Differenzierung von hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie	Seite 23
1.3	Splitten der Zellen	Seite 24
1.4	Zellzahlbestimmung	Seite 24
1.5	Einfrieren der Zellen	Seite 24
1.6	Hochdichte dreidimensionale Zellkultursysteme	Seite 25
1.7	Pellet-Kultur	Seite 25
1.8	Membran-Kultur	Seite 26
2.	Molekularbiologische Analyse	Seite 27
2.1	RNA-Isolierung	Seite 27
2.2	cDNA-Synthese	Seite 27
2.3	Real-Time PCR	Seite 28
2.4	Anfertigung von histologischen Schnitten	Seite 29
2.5	Alcian Blau Färbung	Seite 29
2.6	Immunhistochemische Färbung	Seite 30
III	Ergebnisse	Seite 32
1.	Expression knorpelspezifischer extrazellulärer Moleküle	Seite 32

2.	Expression fibroblastäres Kollagen Typ I	Seite 35
3.	Expression des Hypertrophiemarkers Kollagen Typ X	Seite 36
IV	Diskussion	Seite 37
1.	Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen	Seite 37
1.2	<i>In-vitro</i> -Herstellung künstlichen suffizienten Knorpelgewebes	Seite 39
1.3	<i>In-vitro</i> -Differenzierung von MSCs in 3D- Zellkulturen	Seite 40
2.	Vergleich zweier trägerfreier 3D-Kultursysteme bei der chondrogenen Differenzierung von hMSCs	Seite 42
2.1	Einfluss von Sauerstoff auf die chondrogene Differenzierung	Seite 43
2.2	Material des Zellträgers	Seite 44
2.3	Einfluss des Metallträgers	Seite 47
2.4	Einfluss des hydrostatischen Drucks	Seite 47
2.5	Einfluss der Zellpassage	Seite 48
2.6	Einfluss von Wachstumsfaktoren	Seite 49
2.7	Hypertrophie der hMSCs	Seite 52
V	Zusammenfassung	Seite 54
VI	Abbildungsverzeichnis	Seite 56
VII	Abkürzungsverzeichnis	Seite 58
VIII	Literaturverzeichnis	Seite 60

## I Einleitung

### 1. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten ist eine steigende Morbiditätsrate bei degenerativen Gelenkerkrankungen zu verzeichnen, die hauptsächlich auf folgende Parameter zurückzuführen ist: längere Lebenszeit, ungesunde Ernährung, mangelnde Bewegung oder ausgeprägter Leistungssport. Da Knorpelgewebe nicht in der Lage ist, sich zu regenerieren, steigt die Anzahl an Hüft-Endoprothesen-Erstimplantationen (im Jahre 2007 auf 152.338 in Deutschland; BQS-Bundesauswertung 2007; Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung GGMBH).

Durch eine Knorpeldegeneration wird die Lebensqualität der Betroffenen stark beeinträchtigt. Deshalb werden sowohl die Vorbeugung als auch die Behandlung von Gelenkerkrankungen intensiv erforscht. Zu diesem Zweck setzen sich Wissenschaftler einerseits mit der Entwicklung, dem Aufbau, der Biomechanik, der Physiologie und der Pathophysiologie des Gelenkknorpels, andererseits mit der Pathogenese von degenerativen Gelenkerkrankungen auseinander.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden in der regenerativen Medizin umgesetzt, um implantierbare knorpelähnliche Geweberegenerate *in vitro* herzustellen. Mit der Deckung eines Knorpeldefektes durch ein Geweberegenerat soll die funktionelle Oberfläche des Gelenkes ausgebessert werden.

Aufgrund des chondrogenen Differenzierungspotentials von mesenchymalen Stammzellen (MSCs), versucht man MSCs *in vitro* zu artikulären Chondrozyten zu differenzieren. Hierbei werden auch Erkenntnisse über die Chondrogenese *in vivo* verwendet.

Für die vorliegende Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) in dreidimensionalen, trägerfreien, hochdichten Zellkulturen kultiviert. Zwei Kultivierungstechniken, die Membran-Kultur und die Pellet-Kultur, wurden dabei verwendet und miteinander verglichen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie erfolgreich die chondrogene Differenzierung von hMSCs in Passage 7 erfolgt, wenn Zellen einerseits in flüssigem Nährmedium, andererseits an der Luft-Nährmedium-Grenze kultiviert werden. Zur Induktion der Chondrogenese wurde das Nährmedium mit den die Chondrogenese induzierenden Wachstumsfaktoren versetzt.

## 2. Knorpelarten

Die drei Knorpelarten, die im Organismus eines erwachsenen Menschen vorkommen, unterscheiden sich in ihren mechanischen Eigenschaften. Diese hängen von dem Aufbau der extrazellulären Matrix ab. So verleiht der überwiegende Anteil an Kollagen Typ I dem *Faserknorpel* Reißfestigkeit, während elastinhaltige Fasern dem *elastischen Knorpel* Elastizität gewähren. Der überwiegende Anteil der hygrokopischen Proteoglykanen und das Fasernetz aus Kollagen Typ II ermöglichen dem *hyalinen Knorpel* Druckfestigkeit. Dies schafft die Grundlage für seine Stützfunktion (Hardingham 1998).

### 2.1 Molekularer Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM) des hyalinen Knorpels und seine biomechanischen Eigenschaften

In Abb. 1 werden das zugfeste Netzwerk der Kollagen-Fasern und osmotisch wirksame Proteoglykane, die an Hyaluronsäure gekoppelt sind, dargestellt.

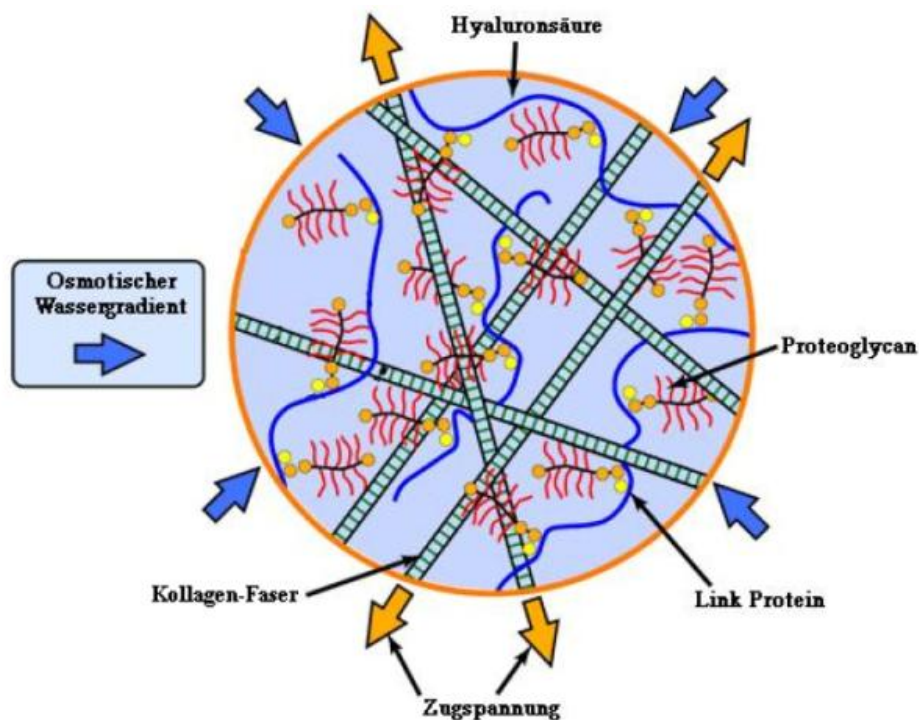


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Druckfestigkeit, der biomechanischen Eigenschaft des hyalinen Knorpels (Hardingham 1998)

Neben ihren biomechanischen Eigenschaften reguliert die extrazelluläre Matrix (ECM) die Differenzierung und Aktivität der Chondrozyten. Die Hauptbestandteile der ECM stellen Kollagen Typ II und Proteoglykane dar (Abb. 2).



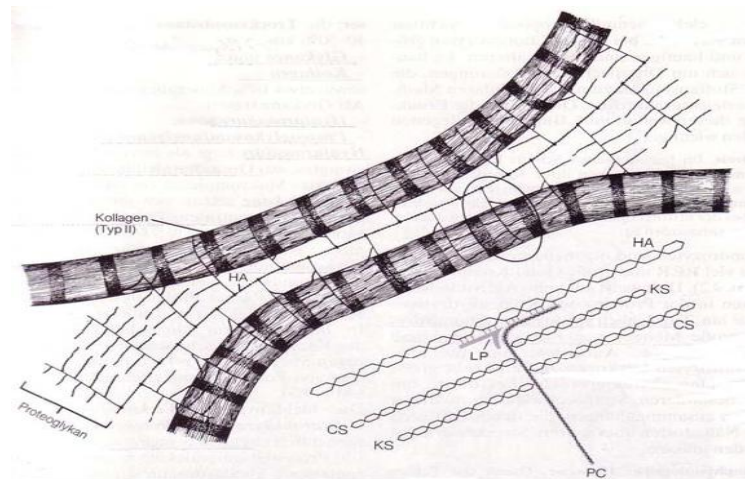


Abb. 2: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der ECM

Das *link protein* (LP) verknüpft das *core protein* der Proteoglykane (PC) an dem *Hyaluronsäuremolekül* (HA). Die *Seitenketten* der Proteoglykane, *Keratinsulfat* (KS) und *Chondroitinsulfat* (CS), binden durch elektrostatische und Wasserstoffbrückenbindungen an Kollagenfasern (Junqueira et al. 1996, 184).

Die Proteoglykane binden Wasser, dessen Anteil 80 % des Knorpelvolumens ausmacht. Andere Proteoglykane, COMP, Matrilin, und Proteoglykane, wie Perlecan und Fibromodulin verbinden unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix miteinander (Abb. 3). Kollagen Typ IX und Kollagen Typ XI verstärken das aus Kollagen Typ II bestehende Fasernetz. Kollagen Typ X wird von prä- und hypertrophen Chondrozyten synthetisiert und kommt in der mineralisierten Schicht des Gelenkknorpels vor.

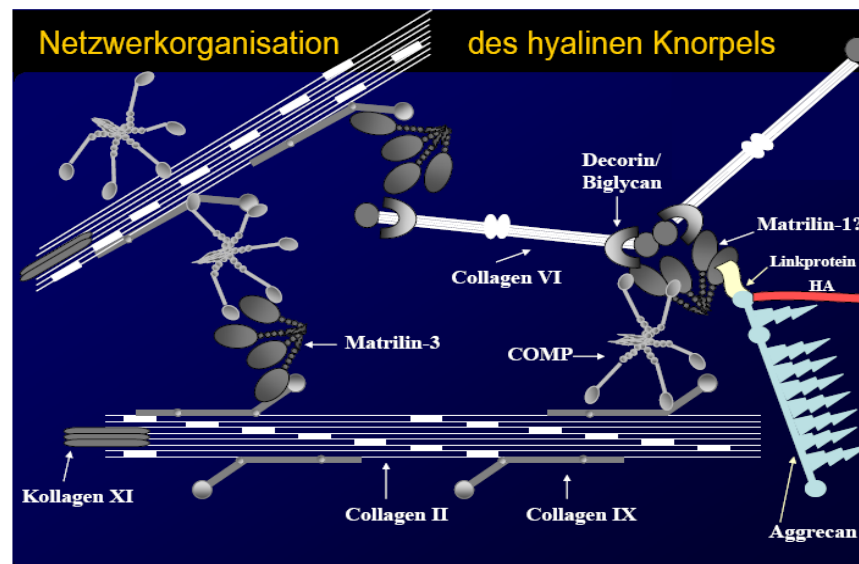


Abb. 3: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der ECM (Grässel 2006)

## 2.2 Histologischer Aufbau des Gelenkknorpels

Charakteristisch für den hyalinen Gelenkknorpel ist die säulenartige Ausrichtung der Chondrozyten, die durch den Verlauf der Kollagen-Fasern bestimmt wird. In Abb. 4 sieht man den Verlauf der Kollagen-Fasern, auf deren Länge sich die Chondrozyten ordnen (Junqueira et al. 1996).

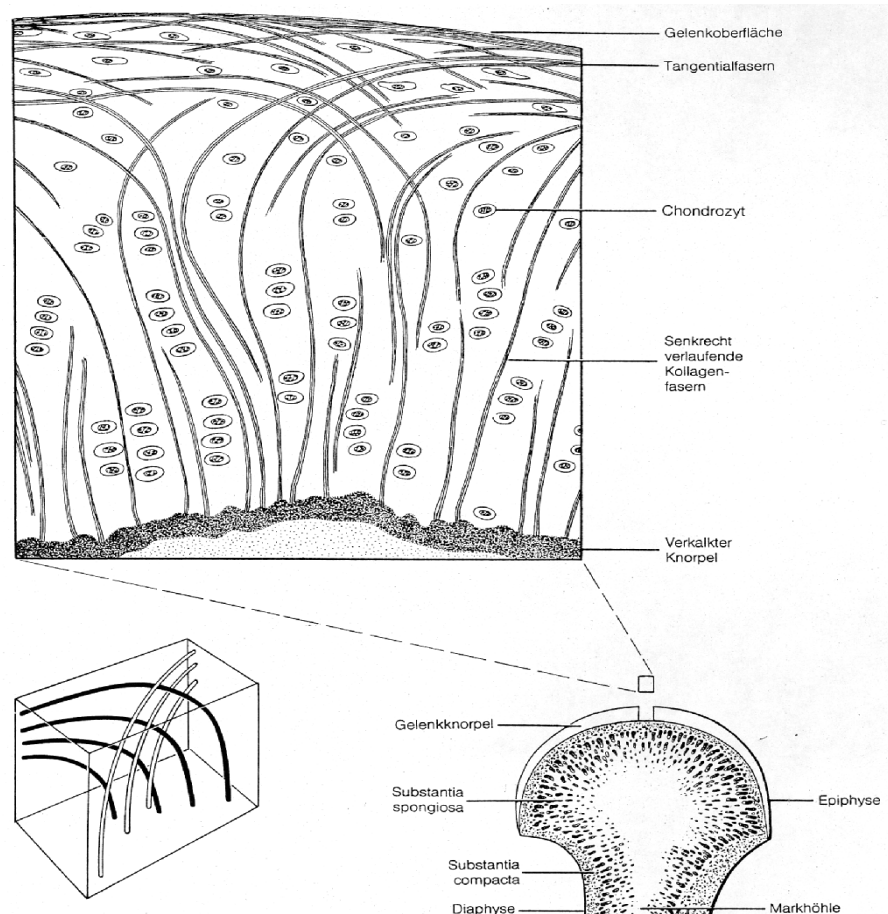


Abb. 4: Gelenkknorpel und Verlauf der Kollagenfaserbündel (Junqueira et al. 1996)

In der obersten Schicht, der *Tangentialfaserzone*, verlaufen die Kollagenfasern arkadenartig, und spindelförmige Zellen liegen parallel zur Oberfläche. Hier ist die Konzentration an Kollagen hoch und an Proteoglykanen gering.

In der zweiten Schicht, der *Übergangszone*, werden die Zellen runder und liegen näher zusammen. Die Konzentration an Proteoglykanen steigt an.

In der dritten Schicht, der *Radiärzone*, kommen stark ausgebildete Kollagenfaserbündel vor, und die Chondrozyten ordnen sich in Säulen an. Hier ist die Konzentration an Proteoglykanen am höchsten.

Durch eine basophile Grenzlinie wird die Radiärzone von der vierten, der *Mineralisierungszone*, getrennt. Diese enthält Kalziumkristalle.

Die oben beschriebenen Knorpelschichten werden in Abb. 5 schematisch und histologisch dargestellt.

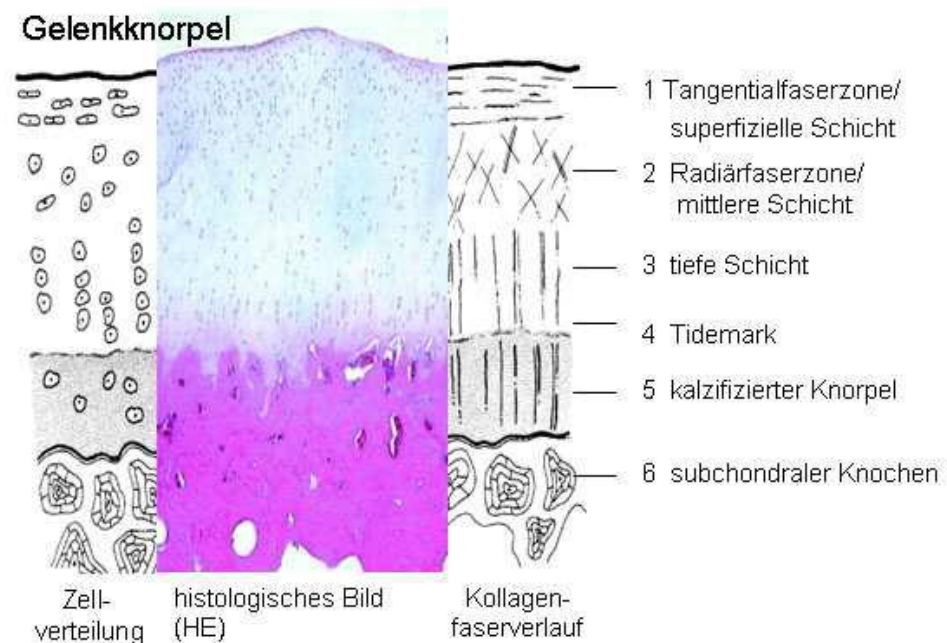


Abb. 5: Morphologie des Gelenkknorpels (von Martinek 2003 modifiziert durch Mandy Seifert 2006) Hier sind die Zusammensetzung sowie die Chondrozytenordnung der vier Gelenkknorpelschichten zu sehen (Buckwalter & Mankin 1998).

### 2.3 Hyaliner Gelenkknorpel - ein bradytrophes Gewebe

Chondrozyten bilden Moleküle, aus denen die extrazelluläre Matrix gebildet wird. Diese erhält wiederum die Form der Zellen und ihren Phänotyp aufrecht.

Das Knorpelgewebe enthält weder Blutgefäße noch Nerven. Deshalb werden Chondrozyten mit Nährstoffen versorgt, die über größere Strecken durch die extrazelluläre Matrix diffundieren. Außerdem werden durch sie neu synthetisierte Moleküle, Wachstumsfaktoren bzw. katabolische Produkte befördert und dort vorübergehend angesammelt.

Mechanisch schützt die extrazelluläre Matrix Chondrozyten vor äußeren Belastungen.

Die mechanischen Belastungen des Knorpels lösen Signale aus, die durch die Matrix auf die Chondrozyten übertragen werden. Diese Signale ändern die metabolische Aktivität der Chondrozyten. Dabei werden elektrische und physikalisch-chemische Reaktionen vermutet. Sie ändern die Beförderung von Nährstoffen sowie von Stoffwechselprodukten im Knorpel (Martinek 2003). Die Synthese von Proteoglykanen und deren Aggregationsgrad wird durch eine chronische Entlastung des Knorpels verringert. Dadurch wird eine biomechanische Eigenschaft, die Druckfestigkeit, reduziert.

### 3. Relevante Ursachen von Knorpeldefekten

Traumatische Verletzungen des Knorpels sind eine Ursache für den Beginn einer degenerativen Erkrankung. Ein akutes oder sich wiederholendes mechanisches Trauma führt zu pathologisch-degenerativen Abläufen mit nachfolgendem Knorpelverlust (Carter et al. 2004). Die Abläufe der Arthrose sind bis heute nicht vollständig aufgeschlüsselt. Primär kommt es zum Bruch des Matrix-Netzwerkes auf der Molekularebene, insbesondere der Aggrecane, wodurch der Wassergehalt der Matrix ansteigt. Infolge der Beschädigung von Kollagen Typ IX und Typ XI, die das Kollagenetzwerk verbinden, nimmt die Festigkeit des Knorpels ab. Außerdem zerstören katabole Enzyme die Matrix des Knorpels (Martinek 2003).

Im Körper werden Knorpeldefekte nach traumatischen chondralen und osteochondralen Verletzungen mit einem knorpelartigen Gewebe gedeckt. Die biomechanischen Eigenschaften dieses Gewebes sind aber schlechter, als die des normalen Knorpels und entsprechen denen des Faserknorpels.

Die Reparatur chondraler und osteochondraler Knorpeldefekte geschieht auf unterschiedliche Art und Weise. Bei *chondralen* Defekten werden Synthese und Teilung der Zellen durch Zelluntergang und -degeneration induziert. Der Gewebeverlust kann aber nicht vollkommen aufgehoben werden.

*Osteochondrale* Defekte werden zuerst mit Blut und Knochenmark aus der traumatischen Eröffnung des Knochenmarkraums ausgefüllt. Dieses Blut enthält vasoaktive Mediatoren und Wachstumsfaktoren, wie TFG- $\beta$ , die von Thrombozyten synthetisiert werden. Sie aktivieren die Vaskularisierung, die Migration sowie die Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten.

Die neu differenzierten Chondrozyten synthetisieren Moleküle, aus denen die extrazelluläre Matrix entsteht. Das entstandene Gewebe kann jedoch den Druck schlechter verteilen, als normaler Knorpel. Infolgedessen degenerieren die neu differenzierten Chondrozyten schnell. Das neu gebildete knorpelartige Gewebe hat im Vergleich zum hyalinen Knorpel minderwertige biomechanische Eigenschaften, wie schwächere Festigkeit, erhöhte Permeabilität, einen anders geordneten Faserverlauf und lichtmikroskopisch erkennbare Lücken zwischen dem alten und dem neuen Knorpel aufgrund des ausbleibenden Anstieges der Syntheseleistung und der Zellteilung in dem benachbarten Knorpelgewebe. Dieses Gewebe trägt sowohl lichtmikroskopische und histochemische Merkmale von hyalinem Knorpel, als auch von Faserknorpel (Buckwalter und Brown 2004).

## **4. Therapien von Knorpeldefekten**

### **4.1 Operative Therapieformen**

Bei Techniken, wie z. B. der Arthroskopie mit Debridement oder Abrasionsarthroplastik, der subchondralen Anbohrung und der Mikrofrakturierung wird subchondraler Knochen penetriert, so dass das Blut mit MSCs aus dem Knochenmark den Knorpeldefekt ausfüllt. Die Anwendung dieser Methode bei jungen Patienten mit traumatischen chondralen und osteochondralen Defekten kann gegebenenfalls zur Besserung der Beschwerden führen (Buckwalter und Brown 2004). Durch autologe osteochondrale Transplantate verbessern sich ebenfalls klinische und radiologische Resultate (Resinger et al. 2004).

Auch die biologische Fähigkeit des Perichondriums bzw. des Periosts hyalinartigen Knorpel zu bilden, wird verwertet. Perichondrium- oder Periostlappen werden in Knorpeldefekte entweder eingenäht oder mit Fibrin geklebt, was als „Perichondrium-“ oder „Periostlappenplastik“ bezeichnet wird (Hangody et al. 1998).

Alle bislang verwendeten chirurgischen Strategien führen jedoch noch nicht zu den erwünschten Resultaten einer Wiederherstellung des hyalinen Knorpels. Ihre Anwendung ist bei Arthrose entweder eingeschränkt oder sogar kontraindiziert (Resinger et al. 2004).

### **4.2 Tissue Engineering**

Biologen, Materialwissenschaftler und Mediziner forschen gemeinsam auf dem Gebiet der modernen Transplantationschirurgie, um Regenerate für die Behandlung geschädigter Gewebe *in vitro* herzustellen (Patrick et al. 1998). Dieses Gebiet wurde als „Tissue Engineering“ bezeichnet (Vacanti 1991; Langer et al. 1993) und stellt einen Teil der „Regenerativen Medizin“ dar (Niemeyer et al. 2004).

Das künstliche Gewebe wird durch die Differenzierung von Zellen, die in oder auf ein Matrix-Konstrukt gebracht wurden, unter angepassten Bedingungen in Zellkulturen entwickelt. Die Zellquelle stellen primäre organspezifische Zellen und Stammzellen dar. Für die Wiederherstellung von Knorpelgewebe verwendet man entweder autologe Chondrozyten oder Stamm- und Progenitorzellen, die ein Potential, sich chondrogen zu differenzieren, aufweisen. Die Zellen werden aus Gewebebiopsaten gewonnen und in Monolayer-Kultur vermehrt, um eine ausreichende Menge an Zellen zu schaffen. Für die anschließende Redifferenzierung der Chondrozyten und die Differenzierung der MSCs werden die Zellen auf eine Trägermatrix gebracht, die aus synthetischen oder

biologischen Materialien besteht (Sittinger et al. 2004). Anschließend erfolgt die Implantation der autologen redifferenzierten Chondrozyten in Knorpeldefekte der Patienten. Diese Therapieform wird als Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) bezeichnet (Brittberg et al. 1994).

Eine der ersten Chondrozytentransplantationen wurde 1970 am Childrens Hospital in Boston von dem Orthopäden Green durchgeführt: Eine Knochenspan-Matrix mit Chondrozyten wurde in Nacktmäuse transplantiert.

Mithilfe der Differenzierung von MSCs in Richtung der chondrogenen Linie versucht man implantierbares künstliches knorpelähnliches Gewebe herzustellen (Pittenger et al. 1999), das zur Unterstützung der Heilung in den Knorpeldefekt eingebracht werden kann. So erfolgte Versuch, in dem aus *in vitro* differenzierten porcinen synovialen MSCs produzierter Konstrukt *in vivo* in den porcinen chondralen Defekt implantiert worden war (Ando et al. 2007; Shimomura et al. 2010).

## 5. Chondrogenese *in vivo*

### 5.1 Knorpelentstehung und Gelenkbildung

Während der embryonalen Entwicklung bildet das Skelettsystem zuerst den Knorpel aus. Dieser verknöchert bis auf die Oberflächen der Gelenke (Vortkamp 2003), wie es in Abb. 6 zu sehen ist.

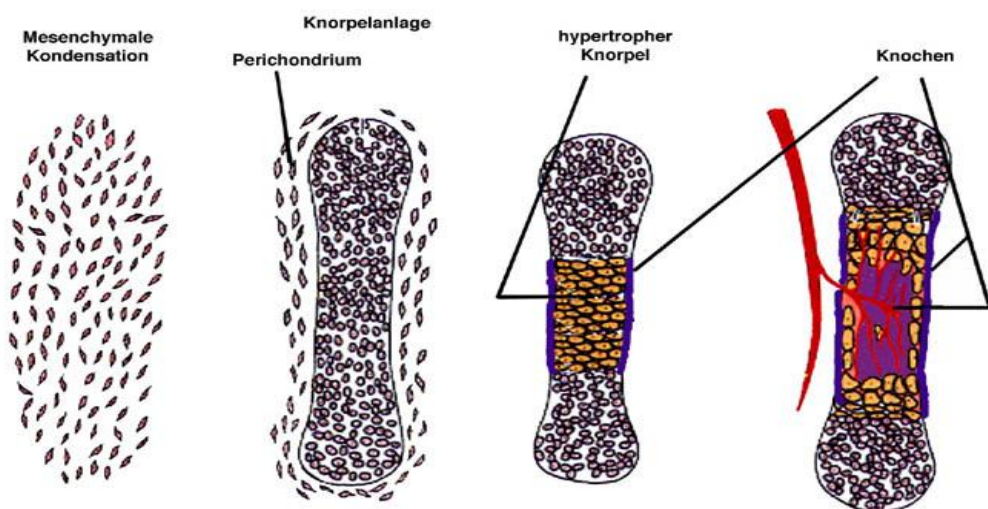


Abb. 6: Endochondrale Ossifikation (Vortkamp 2003)

Das knorpelige Skelett bildet sich aus Chondrozyten, die aus mesenchymalen Zellen differenzieren. Aus mesenchymalen Zellen, die die knorpeligen Elemente umgeben, entwickelt sich das Perichondrium. Aus den Zentren entwickeln sich zu beiden Enden hin Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten. Anschließend wachsen in den hypertrophen Knorpel Blutgefäße ein, durch die Osteoblasten und Osteoklasten einwandern. Der Knorpel wird durch Knochen ersetzt (Vortkamp 2003).

Prächondrozyten differenzieren erst zu frühen und dann zu artikulären Chondroblasten. Die letzteren differenzieren sich am Ende der postnatalen Entwicklung zu artikulären Chondrozyten, die sich kaum noch teilen. Die artikulären Chondrozyten synthetisieren Moleküle der extrazellulären Matrix, unter anderem einen hohen Anteil an Aggrecan und nach Abschluss der Chondrogenese relativ wenig Kollagen Typ II. Sie durchlaufen keine Entwicklung zu hypertrophen Chondrozyten mit Ausnahme der Zellen in der Zone des mineralisierten Knorpels (Girkontaite et al. 1996). Im permanenten Knorpelgewebe wird mittels einer negativen Regulation durch spezifische Faktoren das Stadium von hypertrophen Chondrozyten nicht erreicht (Vortkamp 2003).

In Abb. 7 kann man das Erscheinungsbild des sich entwickelnden Knochens sowie die Reihenfolge der Zelltypen jeder Entwicklungsstufe der Chondrogenese erkennen.

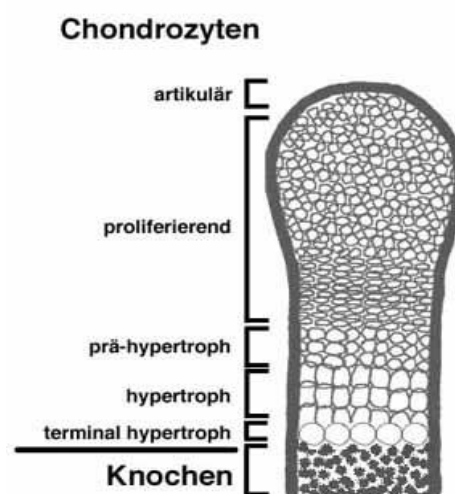


Abb. 7: Wachstumszonen des endochondralen Knochens (Vortkamp 2003)

Der Beginn des Differenzierungsprozesses von MSCs zu hypertrophen Chondrozyten liegt im Zentrum des embryonalen Knochens. Zeitlich versetzt breitet sich der chondrogene Differenzierungsprozess peripher aus.



## 5.2 Entwicklungsstufen der Chondrogenese

Die Chondrogenese wird in folgender Tabelle übersichtlich dargestellt:

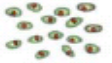

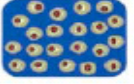




Zelltyp	Erscheinungsbild	ECM Marker	Regulatorische Marker
Mesenchymale Zelle		Kollagen Typ I	SOX9, CBFA1
Prä-chondrozyt		N-CAM, Tenascin C (Kollagen Typ II)	SOX9 (SOX5, SOX6)
Früher Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein (COMP, Matrilin 1)	SOX5, SOX6, SOX9 (FGFR3, ATL2)
Säulenförmiger Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1	SOX5, SOX6, SOX9 FGFR3, ATL2
Prähypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1 (Kollagen Typ X)	PTHRI, IHH, CBFA1, RUNX3
Hypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ X	CBFA1, RUNX3, VEGF, (c-MAF)
Terminaler Chondrozyt		Matrix-metalloproteinase 13, Osteopontin	CBFA1, c-MAF

Abb. 8: Die Stadien der Chondrogenese *in vivo* (nach Lefebvre & Smits 2005), unterteilt nach Zelltyp, Erscheinungsbild der Zellen, extrazellulärer Matrix (ECM) Marker und regulatorischer Marker

Die Abb. 8 zeigt alle Entwicklungsstufen der Chondrogenese. Hier werden im Speziellen die synthetisierten Moleküle der ECM und die regulatorischen Marker aufgeführt. Während sich die mesenchymalen Zellen ansammeln, werden sowohl Zelladhäsionsmoleküle, wie N-Cadherin und NCAM (Neural Cell Adhesion Moleküle), als auch Matrixmoleküle, wie Tenascin C und Versican, detektiert. Sie ermöglichen Interaktionen zwischen einer zu differenzierenden Zelle und den sie umgebenden Zellen und Molekülen der extrazellulären Matrix (Solursh 1991; Cancedda et al.1995; 2000). Es wird davon ausgegangen, dass diese mesenchymal- /epitelialem Zellinteraktionen die Ansammlung mesenchymaler Zellen regulieren (Tuan 2004; Maleski et al. 1996; Toole 2001). Nach dem Abschluss der Kondensation endet die Expression mesenchymaler Zellmarker und Marker der Zellkondensation.

Aus MSCs entwickeln sich Prächondrozyten in den Zentren dieser Zellansammlungen, die mit der Synthese von Molekülen der ECM, zuerst von Kollagen Typ II, beginnen.



Aus Prächondrozyten entstehen frühe Chondroblasten. Diese teilen sich verstärkt und weisen eine zunehmende Syntheseleistung auf. Sie produzieren nicht nur Kollagen Typ II, sondern auch andere Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Aggrecan, Link Protein, Kollagen Typ IX und Kollagen Typ XI. Außerdem beginnen sie, die Transkriptionsfaktoren SOX 5 und SOX 6, initiiert durch den Transkriptionsfaktor SOX 9, zu synthetisieren.

Aus den frühen Chondroblasten entstehen prähypertrophe Chondroblasten. Es handelt sich um große Zellen mit zehnmal größerem zytoplasmatischem Volumen, die sich nicht mehr teilen. Sie produzieren vor allem Aggrecan und Kollagen Typ II. Außerdem werden bei den Zellen die Gene für Wachstumsfaktoren, wie *Indian hedgehog* (Ihh), sowie *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) und die Gene für Matrixprotein Kollagen Typ X aktiviert.

Aus prähypertrophen Chondroblasten entstehen prähypertrophe Chondrozyten. Sie synthetisieren vermehrt Kollagen Typ X. Hier wird die Expression von Ihh und von PTHrP beendet.

### 5.3 Regulation der Chondrogenese

Über die Regulation der frühen Chondrogenese ist bis heute wenig bekannt. Die Vorgänge, wie Zellwachstum, Zellproliferation, Chondrogenese und Hypertrophie werden von mehreren Hormonen und Wachstumsfaktoren geregelt. Ihre Wirkungen werden durch spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt (Healy et al. 1999). Außerdem beteiligen sich die Moleküle der extrazellulären Matrix an der Regulation der Chondrogenese. Wachstumsfaktoren, wie Signalmoleküle *transforming growth faktor* (TGF), *fibroblasten growth faktor* (FGF) und *Indian hedgehog* (Ihh), *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP), beteiligen sich an drei zurzeit entdeckten Signalwegen in der Chondrogenese (Vortkamp et al. 1996). Der Effekt von Wachstumsfaktoren wird in Abb. 10 am Beispiel des TGF- $\beta$ -Signalwegs dargestellt:

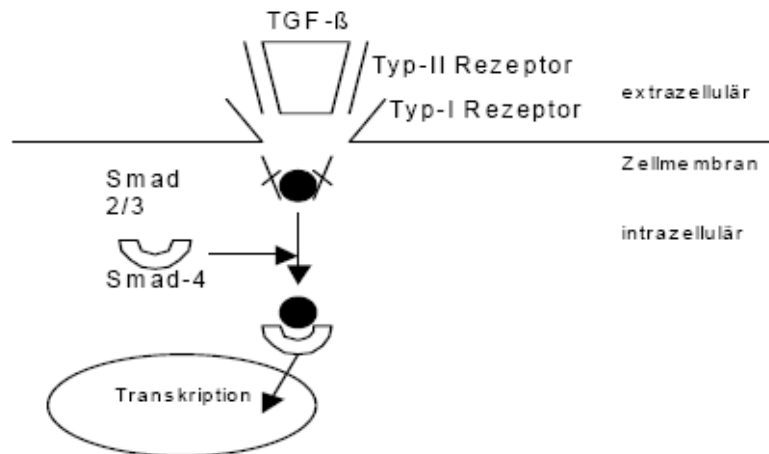


Abb. 10: Schematische Darstellung der Signalübertragung des TGF- $\beta$   
(mod. nach Derynck et al. 1988 durch Kaschte 2007)

Über die Bindung des Zytokins TGF- $\beta$  an spezifische Membranrezeptoren leiten die zytoplasmatischen Proteine, die als „Smad“ bezeichnet werden, das Signal in den Zellkern. „Smad“ wird aus Sma (*small body size*) und Mad (*mothers against decapentaplegic*) zusammengesetzt. Während Smad 2 und 3 das TGF- $\beta$  Signal übertragen, wird das Signal durch Smad 6 und 7 blockiert. Smad 4 stellt einen Mediator dar. Im Zellkern werden die Aktivität der Gene sowie die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren geregelt (Balemans et al. 2002).

In Abb. 11 kann man das Netzwerk aus Ihh/PTHr-, BMP- und FGF-Signalen erkennen, welche die Chondrogenese regulieren. Im Weiteren folgt die Beschreibung der Abläufe dieses Netzwerkes. Die prähypertrophen Chondrozyten exprimieren Ihh in der endochondralen Ossifikation (Provot & Schipani 2005). Ihh und PTHrP regulieren die Initiierung der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten in einer negativen Rückkoppelungsschleife. Diese Ihh/PTHr-Rückkoppelungsschleife (Juppner 2000) hemmt die Differenzierung der Zellen, die Ihh exprimieren. PTHrP signalisiert, dass die proliferierenden Chondrozyten in einem nichthypertrophen Zustand aufgehalten werden (Minina et al. 2000, 2002). Dies erfolgt über den PTH-Rezeptor, den die proliferierenden Chondrozyten exprimieren. Dadurch wird die Quote der Entwicklung von prähypertrophen Chondroblasten in den prähypertrophen Zustand kontrolliert.

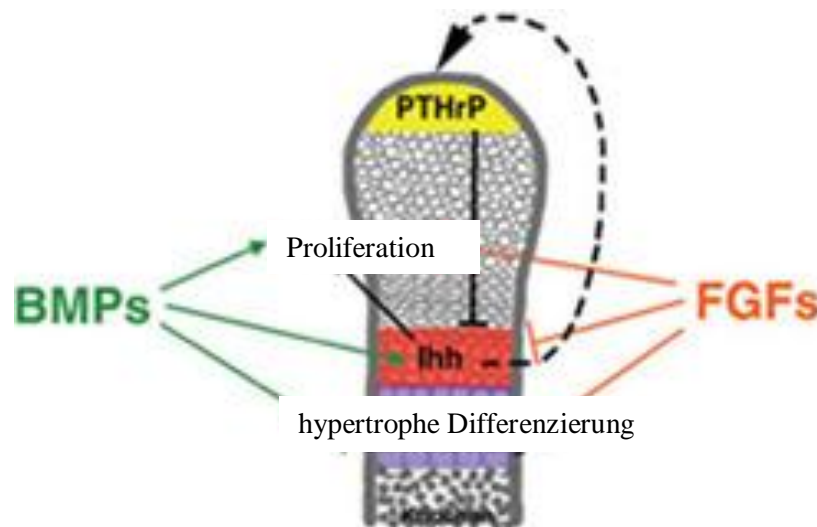


Abb. 11: Kontrolle der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten (Vortkamp 2003)

Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine. Sie initiieren die Expression verschiedener Moleküle, die sich an der Ansammlung mesenchymaler Zellen, der Proliferation und der chondrogenen Differenzierung beteiligen (Lefebvre & Smits 2005). Die erforschten Proteine sind die Transkriptionsfaktoren der Gruppe SOX (*Sry Type High Mobility Group Box*), wie SOX 9, SOX 5, SOX 6. So regelt SOX 9 die frühe Chondrogenese und regt die Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen Typ II, Kollagen Typ XI und Aggrekan, an (Healy et al. 1999).

Auf der Regulationsebene von Kontakten zwischen Zellen und extrazellulären Molekülen ist vor allem die Interaktion von Hyaluronsäure mit dem CD44-Rezeptor zu erwähnen. Dieser Rezeptor wird sowohl von MSCs, als auch von Chondrozyten exprimiert (Pittenger et al. 1999). So steigt TGF- $\beta$  mRNA, einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Chondrogenese, an, indem der CD44-Rezeptor bei Chondrozyten durch Hyaluronsäure aktiviert wird (Ishida et al. 1997).

## 6. Verwendung autologer Chondrozyten zur Behebung von Knorpeldefekten

Bei der Transplantation autologer Chondrozyten besteht ein fester Zusammenhang zwischen der Neubildung hyalinen Knorpels und einem guten klinischen Resultat. Die Transplantation von autologen Chondrozyten ist meist nur bei chondralen Defekten anwendbar. Fortgeschrittene Degeneration von Knorpel sowie schlaffe Bänder des ge-

schädigten Gelenkes schränken die Anwendung von autologen Chondrozyten ein (Resinger et al. 2004).

Nach Isolierung und Vermehrung artikulärer Chondrozyten *in vitro* werden diese entweder als Zellsuspension mit einem periostalen Lappen bedeckt (Brittberg et al. 1994) oder als angesiedelte Zellen in einem Trägermaterial implantiert (Erggelet et al. 2003).

Der Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Menge autologer Chondrozyten, die nur durch einen operativen Eingriff aus dem Gelenk entnommen werden können. Darüber hinaus dedifferenzieren Chondrozyten während ihrer Vermehrung in Monolayerkultur zu fibroblastoiden Chondrozyten mit einem veränderten Phänotyp. Sie synthetisieren Kollagen Typ I, während die für Knorpel typischen Gene herunter reguliert werden. Wenn diese dedifferenzierten Chondrozyten dreidimensional angeordnet werden, synthetisieren sie erneut die für Knorpel spezifischen Moleküle, wie Kollagen Typ II und Aggrekan. Dennoch besteht eine hohe Expression von für Knorpel untypischer Moleküle, wie Kollagen Typ I und III (Kaps et al. 2004; Irie et al. 2008). Dieses Phänomen stellt auch heutzutage noch ein Problem dar.

## 7. Verwendung mesenchymaler Stammzellen (MSCs) zur Behebung von Knorpeldefekten

Von Interesse ist die Fähigkeit mesenchymaler Stammzellen, sich chondrogen *in vivo* oder *in vitro* mit geeigneten Induktionsfaktoren differenzieren zu lassen (Barry und Murphy 2004). Erstmals wurden knochenbildende Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer Ratte 1968 von Friedenstein und Kollegen beschrieben (Friedenstein et al. 1968).

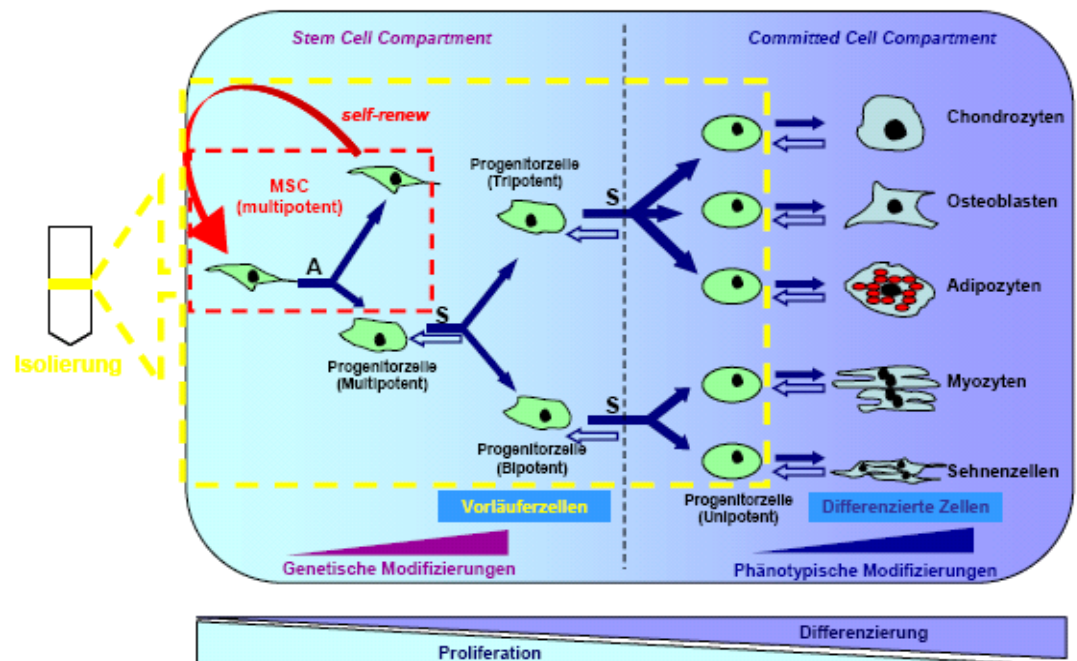


Abb. 9: Schematische Darstellung der Differenzierung von MSCs (Bakch et al. 2004; modifiziert durch Slobodianski 2006)

Während der asymmetrischen Teilung einer mesenchymalen Stammzelle entstehen eine gleichartige Zelle, eine mesenchymale Stammzelle, und eine nicht gleichartige Zelle, die Progenitorzelle. Das Differenzierungspotenzial der Progenitorzelle ist eingeschränkt im Vergleich zu diesem von MSC. Nach der weiteren symmetrischen Teilung der Progenitorzelle entstehen tri- und bipotente Progenitorzellen. Sie haben noch die gleiche Morphologie wie multipotente MSCs, aber ein anderes Muster der Genexpression (Bakch et al. 2004).

## 7.1 Gewinnung von MSCs

MSCs werden durch Punktion des Knochenmarks gewonnen, was im Gegensatz zur Chondrozytenentnahme keine dauernde Schädigung verursacht. Außerdem können MSCs auch aus peripherem Blut (Roufosse et al. 2004), Periosteum, trabekulärem Knochen, Fettgewebe, Synovia, Skelettmuskulatur, Lunge und Nabelschnur isoliert werden (Haynesworth et al. 1992; Fortier et al. 1998; Baksh et al. 2004).

Als Definitionskriterien für MSCs gelten die Adhärenz an Plastikoberflächen, das multipotente Differenzierungspotential und die Expansionseigenschaften (Baksh et al. 2004).

MSCs exprimieren eine Vielzahl an Oberflächenmolekülen, dennoch wurden bisher keine ausschließlich für MSCs typischen Markermoleküle gefunden. Die bis heute entdeckten MSC-Oberflächenmoleküle sind auch in anderen Zelltypen zu finden. Deshalb ist es bislang nicht möglich, MSCs während der Isolierung über den Phänotyp besser anzureichern, als über ihre Adhärenzfähigkeit. Die gewonnenen MSCs werden auch auf die Oberflächenmoleküle, wie die Standardmarker von MSC CD 105, CD 73 und CD 90 (Jones et al. 2002; Internationale Assoziation für zelluläre Therapie 2006 (engl. *International Society for Cellular Therapy* (ISCT))) und auf den Standardmarker für Progenitor-Zellen mit chondrogener Vordifferenzierung CD 106 (De Ugarte et al. 2003) mithilfe der FACS-Analyse untersucht. Von den hämatopoetischen Vorläuferzellen werden MSC durch CD 14, CD 34 und CD 45 unterschieden, welche bei MSCs fehlen. Ein relevantes Oberflächenmolekül ist CD 44: mit diesem Rezeptor interagiert Hyaluronsäure (Ishida et al. 1997). MSCs weisen den folgenden hypoimmunologischen Phänotyp auf: MHC-I<sup>+</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, CD 40<sup>-</sup>, CD 80<sup>-</sup>, CD 86<sup>-</sup>, der nach der Differenzierung gleich bleibt (Tse et al. 2003).

Die Isolierungsmethode beeinflusst Art und Menge der gewonnenen Zellen. Bisher gibt es kein allgemeines, annehmbares, normiertes Verfahren (Pittenger et al. 1999). Zurzeit werden MSCs mittels der am meisten gebrauchten Ficoll-Gradienten Methode isoliert.

Die mononukleären Zellen werden von Erythrozyten und Granulozyten durch einen Ficoll-Gradienten getrennt (Haynesworth et al. 1992). Hierbei wird die Probe vorsichtig mit Ficoll langsam überschichtet. Nach der Zentrifugation sind die mononukleären Zellen in einer Schicht zwischen Plasma und Ficoll (Abb. 12).

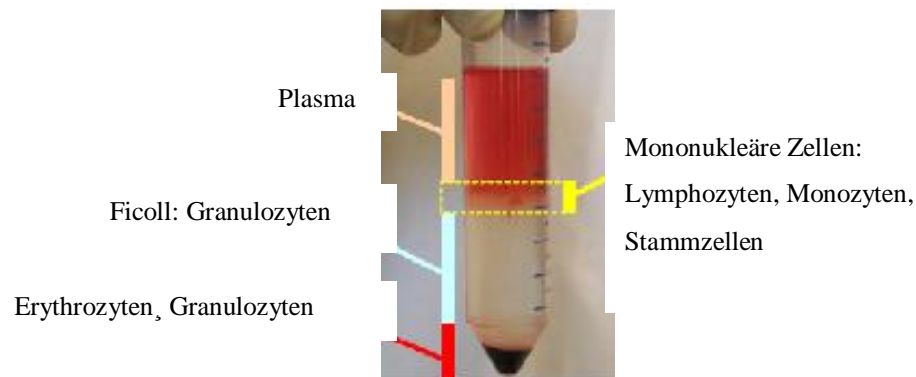


Abb. 12: Die Auftrennung der Zellsuspension im Ficoll-Gradienten (nach Slobodianski 2006)  
Die Phase zwischen Ficoll und Plasma (gelbe Markierung) enthält mononukleäre Zellen (MNC), darunter Stammzellen.

Aus dieser mononukleären Zellmischung werden die MSCs von den hämatopoetischen Zellen durch ihre charakteristische Eigenschaft, sich an Plastikoberflächen zu adhären, getrennt. Hierbei weisen diese adhärenzfähigen Zellen einen fibroblastoiden Phänotyp auf.

Anschließend werden die gewonnenen MSCs zur Vermehrung in die Monolayerkultur aufgenommen. Bei der Kultivierung von empfindlichen MSCs wird dem Medium fetales Rinderserum zugefügt (Bruder et al. 1997), das aus dem Blut von Rinderfeten hergestellt wird. Das Rinderserum enthält unterschiedliche Proteine, darunter Wachstumsfaktoren, die noch nicht alle identifiziert worden sind.

Die Intensivierung der Zellanreicherung wird dadurch erreicht, dass der Wachstumsfaktor bFGF zum Nährmedium zugefügt wird. Hier wird eine Erhöhung von 40 PDs (Population Doubling) auf 70 PDs beschrieben, wobei die Differenzierungsfähigkeit bis 50 PDs erhalten bleibt (Bianchi et al. 2003). Da die MSCs ihre Fähigkeiten bei der Kryokonservierung beibehalten, ist ihre dauerhafte Lagerung möglich (Bruder et al. 1997).

## 7.2 Anwendungen mesenchymaler Stammzellen

Gewonnene MSCs können einerseits in den Knorpeldefekt implantiert werden, um eine chondrogene Differenzierung dort zu induzieren, oder zuerst *in vitro* Richtung der chondrogenen Linie differenziert werden, um dann als künstliches Gewebestück in den Knorpeldefekt implantiert zu werden.

In einer Studie (Wakitani et al. 2002) wurden hMSCs in Knorpeldefekte medialer Femurcondylen bei Arthrose implantiert. Die histologischen und arthroskopischen Un-

tersuchungen wiesen bessere Ergebnisse auf, als in der Kontrolle. Klinisch unterschieden sich die beiden Gruppen nicht.

In einem anderen Versuch (Wakitani et al. 2004), bei dem in ein Kollagen-Gel eingebettete hMSCs in den Knorpeldefekt der Patella implantiert und mit einem autologen Periostlappen bedeckt wurden, zeigte sich auch eine Verbesserung der klinischen Symptomatik.

Die Differenzierung von MSCs *in vitro* in Richtung der chondrogenen Linie wird in dreidimensionalen Zellkulturen durchgeführt. Die Dreidimensionalität ist einer der Faktoren, welche die chondrogene Differenzierung der Zellen und die Bildung der extrazellulären Matrix unterstützt (Kaps et al. 2004). Um Dreidimensionalität zu erreichen, werden die Zellen entweder zu einem hochdichten dreidimensionalen Zellpellet geformt oder in einer dreidimensionalen Trägerstruktur (engl. *Scaffold*) angesiedelt (Sittinger et al. 1996, 2004).

### **7.3 Differenzierung von MSCs *in vitro* in dreidimensionalen Trägerstrukturen**

Das Material, aus dem eine Trägerstruktur hergestellt wird, muss für Nährstoffe und Abbauprodukte durchgängig, biokompatibel und abbaubar sein. Ihre Abbauprodukte sollten zu dem nicht toxisch sein. Diese Stoffe müssen bei Verwendung im Gelenk großem Druck sowie Druckschwankungen standhalten (Sittinger et al. 2004).

Für die Herstellung der Trägerstrukturen werden entweder biologische oder synthetische Polymere verwendet. Aus biologischen Polymeren werden am häufigsten Kollagen oder Glykoseaminoglykane angewandt. Aus synthetischen Polymeren werden *poly-lactid-acid*, *poly-glycolic acid* und deren Copolymere, wie *poly-lactic-co-glycolic acid*, verwendet. Außerdem wird an biphasischen Trägermaterialien gearbeitet, die spezifisch jeweils den Knochen- bzw. Knorpelaufbau bei osteochondralen Defekten unterstützen.

Im biologischen Material Hyaluronsäure proliferieren humane MSCs und bilden die extrazelluläre Matrix. Dies zeigte sich sowohl bei der *in vitro*-Differenzierung von MSCs von Menschen sowie Kaninchen (Radice et al. 2000), als auch bei der *in vivo*-Differenzierung bei Tierversuchen (Solchaga et al. 2000, 2002). Außerdem wurde festgestellt, dass Schwämme aus Hyaluronsäure auch die Entstehung von hyalinartigem Knorpel und seine Integration begünstigen. Im bioresorbierbaren Polymer-Vlies produzierten Chondrozyten extrazelluläre Matrix (Sittinger et al. 1994).

Als problematisch stellte sich zwar das Einpflanzen der Zellen in die Trägerstruktur und ihre Verbindung zum nativen Knorpel dar; die klinische Anwendung von dreidimensio-



nenalen Transplantaten bei fokalen Knorpeldefekten des Kniegelenkes erwies sich jedoch als aussichtsreich (Erggelet et al. 2003).

Das weitere Forschungsgebiet, das so genannte *in situ Tissue Engineering*, befasst sich mit zellfreien Transplantaten. Das Migrationsverhalten von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen steht hier im Mittelpunkt (Sittinger et al. 2004). Hier werden mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen mit chemotaktisch aktiven Faktoren, wie Chemokinen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, aktiviert, die in diese Konstrukte eingefügt werden. Es entfällt die Gewebebiopsie zur Zellgewinnung und die aufwendige Zellexpansion (Ringe 2006).

#### **7.4 Differenzierung von MSCs *in vitro* in trägerfreien hochdichten 3D-Zellkulturen**

Eine trägerfreie dreidimensionale Kultivierung mit hoher Zelldichte wird als „hochdichte Kultur“ (engl. *high density*) bezeichnet.

Das Verfahren der Sedimentation von MSCs, das zur Entstehung hochdichter Kulturen angewendet wird, ähnelt dem Prozess der Kondensation von MSCs *in vivo* (Thorogood und Hinchliffe 1975; Poole 1991). Sie ermöglicht Interaktionen zwischen zu differenzierenden Zellen und anderen Zellen sowie den Molekülen der extrazellulären Matrix (Solursh 1991; Cancedda et al. 1995). Diese Interaktionen regulieren die Chondrogenese in der embryonalen Entwicklung (Maleski et al. 1996; Toole 2001).

Der Vorteil der hochdichten Zellkultur besteht darin, dass die Entstehung der extrazellulären Matrix durch die hohe Zelldichte unterstützt wird. Außerdem werden autokrine sowie parakrine Signale und die gleichmäßige Ansiedelung der Zellen ermöglicht. In *in vitro*-Studien erreichen in hoher Zelldichte wachsende Osteoblasten und Chondroblasten eine Mineralisation und Differenzierung (Zimmermann et al. 1988).

Nach der Sedimentation von Zellen zu einem multizellulären Aggregat, welches als Organoid oder Pellet bezeichnet wird, erfolgt die Kultivierung entweder im Medium oder auf der Oberfläche des Mediums, das Nährstoffe und Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren enthält. Diese Faktoren sowie die entstehenden Zell-Zell-Kontakte aktivieren bei MSCs die chondrogene Differenzierung.

## 8. Techniken trägerfreier hochdichter 3D-Zellkulturen

Techniken der hochdichten Zellkultivierung unterscheiden sich in der Art der Behandlung des Zellaggregates. Bei der Technik der Pellet-Kultur befindet sich das Zellaggregat im Medium. Bei weiteren Techniken, der hohlen Fasern und der Membran-Kultur, wird das Pellet durch einen Filter vom Medium getrennt. Hier erfolgt die Ernährung des Pellets durch die Diffusion von Nährstoffen durch die Poren. Bei der Membran-Kultur befindet sich das Zellpellet an der Luft-Medium-Grenze, während das Zellpellet bei der Technik der hohlen Fasern vom Medium durch einen umhüllenden Polyethylenfilter getrennt wird (Irie et al. 2008).

### 8.1 Technik der Pellet-Kultur

Die Pellet-Kultur wurde zunächst als Differenzierungsmodell chondrogener Differenzierungen von MSCs verwendet (Johnstone et al. 1998). In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass in Pellet-Kulturen als Modell zur Differenzierungen von MSCs eine extrazelluläre Matrix mit unvollkommenen biomechanischen Eigenschaften gebildet wird (Yang et al. 2004). Diese extrazelluläre Matrix besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I und aus einem geringeren Anteil an Kollagen Typ II. Außerdem enthält sie einen geringeren Anteil an Glykosaminoglykanen als hyaliner Knorpel. Darüber hinaus wird in Pellet-Kulturen Kollagen Typ X gebildet, das auf eine hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten hinweist (Ichinose et al. 2005).

Wachstumsfaktoren und Dexamethason (Mackay et al. 1998), welche die Matrixbildung unterstützen, führen somit nicht zur Bildung von hyalinem Knorpel *in vitro* (Yang et al. 2004). Abhängig von der Entwicklungsphase der einzelnen Zelle reagieren MSCs unterschiedlich auf Wachstumsfaktoren und auf Zell-Zell-Kontakte, da sich die aus dem Knochenmark isolierten MSCs in verschiedenen Entwicklungsphasen befinden. Auch Wachstumsfaktoren entfalten unterschiedliche Wirkungen, je nach Entwicklungsphase der von ihnen beeinflussten Zelle.

Die Differenzierung von MSCs in der Alginat-Kultur führte zur vermehrten Anreicherung von Glykosaminoglykanen. Durch die Kultivierung von hMSCs in Alginat-Kultur versuchte man, einen identischen Differenzierungszustand der Zellen zu erreichen. Danach wurden sie zur Matrixausbildung in die Pellet-Kultur aufgenommen.

Die Pellet-Kultur wurde als Vergleichskontrolle unserer Versuche verwendet.

## 8.2 Technik der Membran-Kultur

Eine andere Technik der hochdichten dreidimensionalen trägerfreien Zellkultur bietet sich zur chondrogenen Differenzierung von MSCs an, die in dieser Arbeit als „Membran-Kultur“ bezeichnet wird. 1928 erfand Fell eine Glass-Technik (*Watchglass*) (Abb. 13), mit der er zum ersten Mal mittels aus Tibiae entnommenem Gewebe von Hühnerembryonen unter dem Einfluss der von ihm entdeckten Phosphatase Knochen und Knorpel zu rekonstruieren versuchte (Fell und Robison 1929).

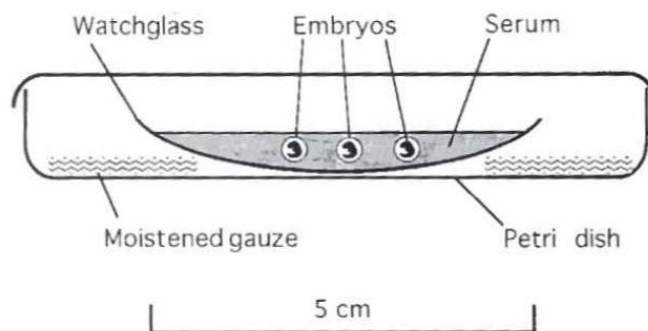


Abb. 13: Aufbau der Glass-Technik (David L. Cockroft 1997)

Diese Technik wurde in der Forschung weiter angewandt und modifiziert (Trowell 1954; Lewis und Irving 1970).

Abb. 14 stellt den Aufbau der „Organoid Kultur“, der Vorgängerin der Membran-Kultur, dar.

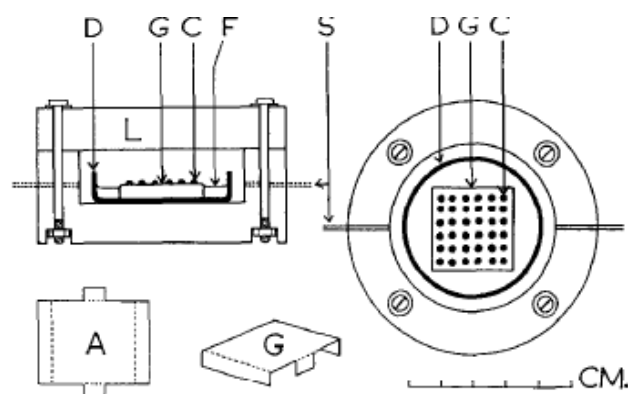


Abb. 14: Aufbau der Organoid-Kultur (Trowell 1954)

Diese Methode wurde entwickelt, um die Ernährung und den Stoffwechsel, einer *in vitro* kultivierten Organ Kultur, zu beobachten (Trowell 1954). Beim Aufbau dieser Technik wurde versucht *in-vitro*-Bedingungen für Zellen zu schaffen, die *in-vivo*-

Bedingungen nachahmen (Fell 1969). Die Technik wurde folgendermaßen aufgebaut: In eine flache Glasschale mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Tiefe von 1 cm (D) wurde eine Trägerstruktur aus engmaschigem Flechtwerk aus Metalldraht mit einer Oberfläche von 25 mm × 25 mm und auf kurze, 4 mm hohe Beine gestellt (A, G). Danach wurde das Medium gegeben, so dass der äußere Mediumstand (F) 1 mm niedriger als die Oberfläche des Papiers lag. Auf die Trägerstruktur wurde das Zellpellet an der Medium-Luft-Interphase kultiviert. Diese Trägerstruktur bestand aus engmaschigem Flechtwerk aus Metalldraht. Die Diffusion von Nährstoffen erfolgte durch die Poren des Papierfilters. L stellte den verriegelten Deckel dar (Trowell 1954).

Diese Kultur wies folgende Vorteile auf: Sie stellte adäquates Material für die Analyse bereit, ermöglichte den Mediumwechsel, das flüssige Medium konnte beliebig, aber genau definiert chemisch zusammengesetzt werden, sowie die gasförmige Umgebung konnte kontrolliert werden (Trowell 1954).

## II Material und Methoden

Die experimentelle Arbeit und ihre Auswertung wurden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Campus Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

### 1. Zellkultur

#### 1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Lonza erworben. Die Charakterisierung als mesenchymale Stammzellen wurde durch die Firma gewährleistet. Eine Expression der Oberflächenmarker (CD 105, CD 166, CD 29, CD 44) durch die Zellen konnte nachgewiesen werden. Eine Differenzierung in Richtung der chondrogenen, osteogenen und adipogenen Linie wurde durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen (Mayer-Wagner et al. 2010).

#### 1.2 Differenzierung von hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie

Vor der Differenzierung der hMSCs in Membran- oder Pellet-Kultur wurde ein Teil der hMSCs während der Proliferation in Passage 6 mit 5 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (RELIATech GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland) stimuliert. Das Erhaltungsmedium setzte sich aus  $\alpha$ -MEM (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 0,6 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zusammen. Die Aussaatdichte auf der Oberfläche einer Kulturflasche betrug 100 000 Zellen pro 85 cm<sup>2</sup> (118 Zellen pro cm<sup>2</sup>).

Im Anschluss wurden nicht stimulierte und mit bFGF stimulierte hMSCs in Passage 7 in zwei Kultursystemen, der Membran-Kultur (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Pellet) und der Pellet-Kultur (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen pro Pellet), in Richtung der chondrogenen Linie über 21 Tage differenziert. Das Medium für die chondrogene Differenzierung setzte sich aus Dulbecco-MEM (high glucose) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 40 IU/ml Penicillin-Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 0,195 mM L-Asc-2-Phosphat, 0,35 mM L-Prolin, 1 $\times$ Insulin-Transferrin-Selenit Zusatz (IST) +1 (10 mg/L Insulin aus Rinderpankreas, 5,5 mg/L humanes Transferrin, 5  $\mu$ g/L Natrium Selenit, 0,5 mg/mL bovines Serum Albumin, 4,7  $\mu$ g/mL Linolsäure) und 1,25 mg/mL

FCS (alle von Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland); 1mM Natriumpyrovat (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zusammen.

Hierbei wurden die Wachstumsfaktoren rh-bFGF (5ng/ml) (RELIATech GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland) und rh-TGF- $\beta_3$  (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), in unterschiedlichen Kombinationen, je nach Differenzierungsgruppe, dem Differenzierungsmedium zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

### **1.3 Splitten der Zellen**

Bei 70 % Konfluenz wurden die hMSCs mit 0,5 % Trypsin-Lösung für 4 Min bei 37 °C im CO<sub>2</sub> Inkubator (Binder, Tuttlingen, Deutschland) behandelt. Die Lösung bestand aus 45 ml Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 5 ml 0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA (Biochrom AG, Berlin, Deutschland).

Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung wurde die Wirkung des Trypsins mit serumhaltigem Medium inaktiviert. Nach der Zentrifugation bei 400 g bei 20 °C für 5 Min (Multifuge1L-R, Heraeus, Thermo Elektron Korporation, Karlsruhe, Deutschland) wurde das Zellpellet zum Ansatz von Pellet- und Membran-Kulturen verwendet.

### **1.4 Zellzahlbestimmung**

Die Zahl vitaler Zellen wurde bestimmt, indem die Zelllösung mit dem Farbstoff Trypan Blau 0,4 % (Gibco Invitrogen Korporation, Karlsruhe, Deutschland) 1:1 verdünnt wurde. Aufgrund der Durchlässigkeit der Membran toter Zellen, im Gegensatz zur Membran lebender Zellen, ist mit diesem Farbstoff eine Auszählung möglich. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und durch die Formel: gemittelte Zellzahl  $\times$  2 (10  $\mu$ l Zelllösung zu 10  $\mu$ l Trypan Blau)  $\times$  10<sup>4</sup>  $\times$  Volumen (ml) die gesamte Zellzahl errechnet.

### **1.5 Einfrieren der Zellen**

Nach der Zentrifugation der Zellen bei 400 g für 5 Min bei 20 °C wurden diese im Einfriermedium im Verhältnis bis  $7 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml resuspendiert und bei -80 °C eingefroren (Gefrierschrank HERA freeze, Heraeus, Thermo Elektron Korporation, Karlsruhe, Deutschland). Das Einfriermedium setzte sich aus 85 % dem hMSC-Erhaltungsmedium (siehe 1.2), 5 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 10 % DMSO (VWR Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammen.

### 1.6 Hochdichte dreidimensionale Zellkultursysteme

Die Differenzierung der hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie erfolgte in hochdichten dreidimensionalen Zellkultursystemen.

Die Zellkulturen wurden im CO<sub>2</sub> Inkubator unter 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 20 % O<sub>2</sub> Bedingungen kultiviert.

### 1.7 Pellet-Kultur

Zum Ansetzen der Pellet-Kultur wurde die Zellsuspension auf  $2 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml standardisiert. Pro Pellet-Kultur wurde 1 ml in Polypropylen-Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) bei 400 g, bei Raumtemperatur (RT) für 5 Min zentrifugiert. Die Zellen wurden im CO<sub>2</sub> Inkubator (Binder, Tuttlingen, Deutschland) mit halbaufgedrehten Deckel zum Gasaustausch kultiviert.

Nach einem Tag bildeten sich aus den Zellen kugelförmige Pellets.

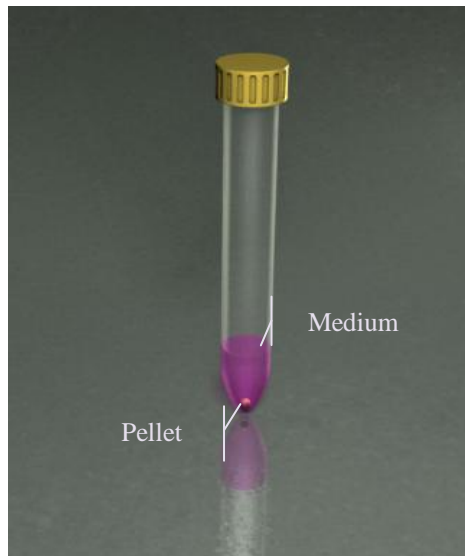


Abb. 15: Technik der Pellet-Kultur

Das Zellpellet befindet sich im Nährmedium (Computergrafische Darstellung von Lars Schliack).

## 1.8 Membran-Kultur

In eine Petrischale (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurde ein aus nichtrostendem Stahl geformtes Gitter eingelegt und das Differenzierungsmedium (siehe 1.2) wurde auf das Gitter in die Petrischale gegeben. Ein Filter aus Zelluloseacetat mit der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde auf das Gitter aufgelegt. Die vorbereiteten Petrischalen wurden für 30 Min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Zellsuspension aus Medium und hMSCs wurde bei 400 g bei 20 °C für 5 Min zentrifugiert, 8  $\mu\text{l}$  wurden mit einer steril abgeschnittenen Pipettenspitze (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) auf die Membran pipettiert.

Das Metalldrahtgitter (Maschenweite 0,63 mm, Drahtstärke 0,22 mm) bestand aus nichtrostendem Stahl (X5CrNiMo17-12-2, V4A, WSt.-Nr.:1.4401; Hagener Feinstahl, GmbH, Hagen, Deutschland).

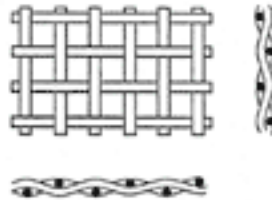


Abb. 16: Drahtgewebe in Leinen-(glatt) Bindung

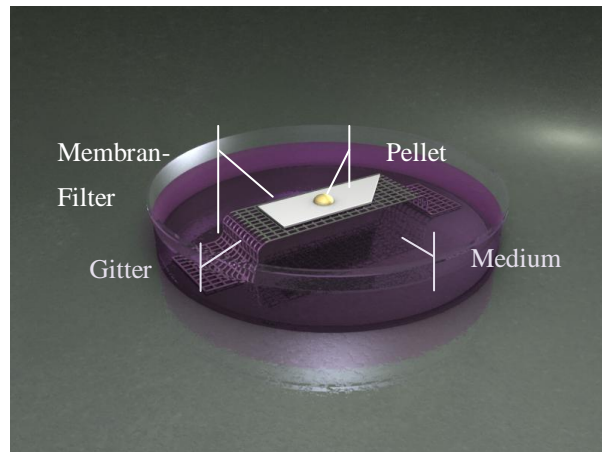


Abb. 17: Die Membran-Kultur  
Das Zellpellet befindet sich an der Gas-Nährmedium-Grenze (Computergrafische Darstellung von Lars Schliack).



## 2. Molekularbiologische Analyse

Diese Kulturen aus zu Chondrozyten differenzierten hMSCs wurden molekularbiologisch mittels quantitativer Real-Time-quantitativer-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR*) auf Expression typischer Marker der Chondrogenese, auf Expression humaner Gene für Kollagen Typ II (COL2A1) und für Aggrekan (ACAN). Außerdem wurden die Zellkulturen auf Expression humaner für hyalinen Knorpel nicht typische Gene für Kollagen Typ I (COL1A2) und für Kollagen Typ X (COL10A1) untersucht. Die quantitative PCR wurde in einem LightCycler (Roche Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

### 2.1 RNA - Isolierung

Die Arbeiten wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. Vor der mRNA-Isolierung wurden die Kulturen zunächst angedaut, indem sie mit 1 mg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) pro Probe bei 56 °C für 1 Stunde im Wasserbad (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) behandelt wurden. Die Wirkung von Proteinase K wurde bei -20 °C inaktiviert. Anschließend wurden die Zellkulturen durch eine Lösung, die aus 10 ml 100 % *RNeasy Lysis Buffer* (RLT-Buffer) und 100 µl 100 % beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland) besteht, homogen lysiert und bei -80 °C gelagert.

Die Durchführung der mRNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen. Die isolierte mRNA wurde in RNase freiem Wasser in 12 µl bei -80 °C gelagert.

Die Messung der mRNA-Konzentration erfolgte im Photometer (RNA/DNA Kalkulator Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) mittels der optischen Dichte.

### 2.2 cDNA - Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte pro Ansatz aus 1 µg der isolierten RNA. Mittels cDNA-Synthese Kit (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde jeweils eine Probe mit dem kompletten Reaktionsansatz versetzt, der aus folgenden Zusätzen bestand:

- 25 mM MgCl<sub>2</sub>,
- Reverse Transkriptase (RT) -10×Puffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 % Triton® X.100),
- 10 mM dNTP Mix,

- 2500 Units Recombinant RNase Ribonuclease Inhibitor,
- 1500 Units AMV Reverse Transkriptase,
- High Concentrate (0,1 M Kaliumphosphat, 0,2 % Triton X®-100, 2 mM DDT und 50 % Glycerol),
- 0,5 mg/ml Random Primer in H<sub>2</sub>O,
- 1,2 Kb positive Kontroll-RNA (0,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O),
- 0,5 mg/ml Oligo (dT) Primer in H<sub>2</sub>O.

Die reverse Transkription der cDNA von mRNA erfolgte im Thermocycler (DNA Engine, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die zuvor synthetisierte cDNA wurde bei - 20 °C (Bosch Thermotechnik GmbH, Buderus, Wetzlar, Deutschland) gelagert.

### 2.3 Real-Time PCR

Hierbei wurden folgende LightCycler®-Primer (Search LC GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet: humanes Cyclophilin B (CPB), humanes Kollagen Typ I  $\alpha_2$ , humanes Kollagen Typ II  $\alpha_1$ , humanes Kollagen Typ X  $\alpha_1$  und humanes Aggrecan.

Die Durchführung erfolgte auf Eis unter standardisierten Bedingungen mittels Kits *Light Cycler Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Zunächst wurden die zu bestimmenden cDNA-Proben 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Außerdem wurden Standardverdünnungen (pro Primer Set) 1:10, 1:100, 1:1000 verwendet. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Jede Probe wurde mit dem folgenden kompletten Reaktionsansatz versetzt: 6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Light Cycler Primer, 2  $\mu$ l SYBR Green Mix (lichtgeschützt). Nach der Zentrifugation (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 2000 upm 30 Sek wurden die Proben in den Rotor gesetzt und folgendermaßen weiterbearbeitet: Denaturierung bei 95 °C für 10 Min, Denaturierung 95 °C für 1 Sek, Primerannealing–primerabhängig 5 Sek, Elongation 72 °C für 20 Sek, Schmelzkurve von 65 °C bis 95 °C, Aufbewahrung bei 4 °C.

Die Fluoreszenz von SYBR Green, dem interkalierenden DNA-Farbstoff, wurde bei 72 °C detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch die Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus, wobei die Fluoreszenz proportional der Menge der PCR-Produkte zunahm. Die Daten wurden mittels der Software LightCycler Version 3 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) analysiert.

Danach erfolgte die relative Quantifizierung der Daten, basierend auf der Normalisierung der Expressionsergebnisse. Dabei wird die Genexpression der untersuchten Zielgene auf das nicht regulierte Housekeeping-Gen Cyclophilin B bezogen.

Die Auswertung und graphische Darstellung der Expressionswerte von Daten erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 2007.

#### **2.4 Anfertigung von histologischen Schnitten**

Nach den Kulturen wurden die Pellets in PBS (Apotheke LMU München) gewaschen und mit 100 % Methanol (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) für 5 Min fixiert. Dann wurden sie mit 5 % Sucrose in PBS bei 4 °C für 30 Min mit Tissue Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Holland) in Cryomoldchen (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Holland) eingebettet.

Die Gewebeschnitte wurden mithilfe eines Mikrotoms (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) in 10 µm Dicke bei - 22 °C gefertigt. Auf Objektträger Menzel-Gläser® Super Frost® Plus (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogene Histoschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur (RT) an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 Min fixiert, dann an der Luft bei RT für 30 Min getrocknet und bei - 20 °C (Premium NoFrost Dura Freez, Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland) gelagert.

#### **2.5 Alcian Blau Färbung**

Unmittelbar vor der Färbung wurden die Schnitte für 15 Min aufgetaut und zuerst kurz in Aqua dest. (Apotheke, LMU, München) und anschließend in 3 % Essigsäure (VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland) für 3 Min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Lösung aus 1 % Alcian Blau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und 3 % Essigsäure (VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland) (pH 2,5) für 60 Min gefärbt. Danach wurden die Schnitte erneut in 3 % Essigsäure und anschließend in Aqua dest. für 1 Min gewaschen. Dann wurden sie mit einer Lösung aus 0,1 % Kernechtrot (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und 5 % AlSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) für 5 Min gegengefärbt. Nach dem Waschen in Aqua dest. für 1 Min wurden die Schnitte zweimalig mit Ethanol (Apotheke, LMU München) in ansteigender Konzentration (40 % -100 %) dehydratisiert. Mit zweimaliger Behandlung in 100 % Xylol (Merck AG, Darmstadt,

Deutschland) erfolgte die Entparaffinisierung der Schnitte. Die Schnitte wurden in DPX (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) eingebettet.

## 2.6 Immunhistochemische Färbung

An der Luft für 15 Min aufgetaute Schnitte wurden in PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 0,1 % Tween20 (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) für 15 Min gewässert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit 30 % Wasserstoffperoxid (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) für 30 Min blockiert.

Nach dem Waschen in PBS mit 0,1 % Tween20 Lösung für 5 Min erfolgte der Enzymverdau mit 0,25 U/ml Chondroitinase (ABC from vulgaris, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pH 7,0 (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) mit 0,02 % Bovine Serum Albumin (BSA) pH 8 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und mit 60 mM Natrium Acetat (Merck AG, Darmstadt, Deutschland). Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5 % Ziegen Serum (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) in PBS mit 3 % BSA für 60 Min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Kollagen Typ II-Antikörper enthaltenden Lösung bei 4 °C über Nacht behandelt. Hierbei wurde ein monoklonaler Maus Anti-Human Kollagen Typ II Antikörper CIIC1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Univ. Iowa, Iowa, USA) in 0,1 % Tween-Lösung mit 1 % BSA 1:6 verdünnt.

Nach dem Waschen in PBS mit 0,1 % Tween20 erfolgte die Behandlung der Schnitte für 60 Min bei Raumtemperatur mit Anti-Maus Biotin Immunoglobulin G vom Pferd (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA), das in PBS mit 0,1 % Tween20 1:200 verdünnt wurden.

Nach dem dreimaligen Waschen in PBS mit 0,1 % Tween20 wurden die Schnitte mit *Avidin-Biotin-Complex* (ABC) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers für 30 Min bei RT behandelt, danach erfolgte dreimaliges Waschen in PBS mit 0,1 % Tween20.

Anschließend wurden die Schnitte mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) nach Angaben des Herstellers für 8 Min bei RT gefärbt. Hier wurde der DAB Substrat Kit Peroxidase SK-4100 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) verwendet.

Nach dem Stoppen der Färbung mit Leitungswasser erfolgte die Dehydratisierung der Schnitte mit aufsteigender Alkoholreihe (40 % - 100 %) und zweimaliger Behandlung mit 100 % Xylol zur Entparaffinisierung.

Anschließend wurden die Histoschnitte mit DPX (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) eingedeckt.

Die Dokumentation der gefärbten Histoschnitten erfolgte mithilfe von Axio Vision, Immersol® im Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

### III Ergebnisse

#### 1. Expression knorpelspezifischer extrazellulärer Moleküle

Dieses Diagramm zeigt die Kollagen Typ II  $\alpha_2$  (COL2A1)-Expression der hMSCs in Passage 7, die in Richtung der chondrogenen Linie differenziert wurden.

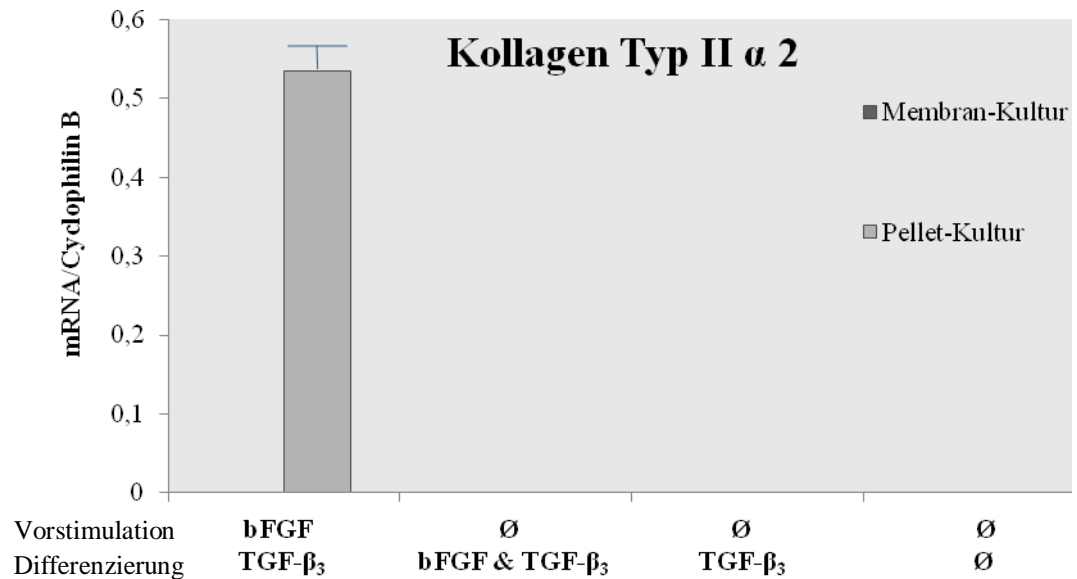


Abb. 18: Relative Quantifizierung von COL2A1 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR. Die Expression von COL2A1 wurde auf die Expression von Cyclophilin B bezogen. Es erfolgte die Vorstimulation mit oder ohne FGF und die Differenzierung zum einen mit TGF- $\beta_3$ , zum anderen mit FGF und TGF- $\beta_3$ .

Die Membran-Kulturen aller Differenzierungsgruppen exprimierten kein COL2A1.

In der Pellet-Kultur synthetisierten die mit FGF vorstimulierten hMSCs, die in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  differenziert wurden, COL2A1.

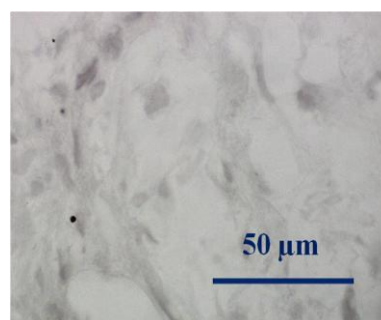


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis von COL2A1 in der Pellet-Kultur. Die immunhistochemische Färbung mit DAB Detektion von Kollagen Typ II. Ausschnitt aus einer Pellet-Kultur, bei der eine Vorstimulierung von hMSCs mit bFGF mit nachfolgender Differenzierung in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  über 21 Tage erfolgt war.

Membran-Kulturen und Pellet-Kulturen, die nicht mit FGF vorstimuliert wurden, wiesen keine COL2A1-Expression auf. Weder die Zugabe von TGF- $\beta_3$  noch die Zugabe von TGF- $\beta_3$  und FGF führte in diesen Kulturen zur Expression von COL2A1.

Dieses Diagramm zeigt die Expression von Aggrekan in Membran-Kulturen und Pellet-Kulturen. Die Vorstimulation erfolgte, wie in Abb. 20 zu sehen ist, teilweise unter Zugabe von FGF. Die Differenzierung erfolgte unter Zugabe einerseits nur von TGF- $\beta_3$ , andererseits von FGF und TGF- $\beta_3$ .

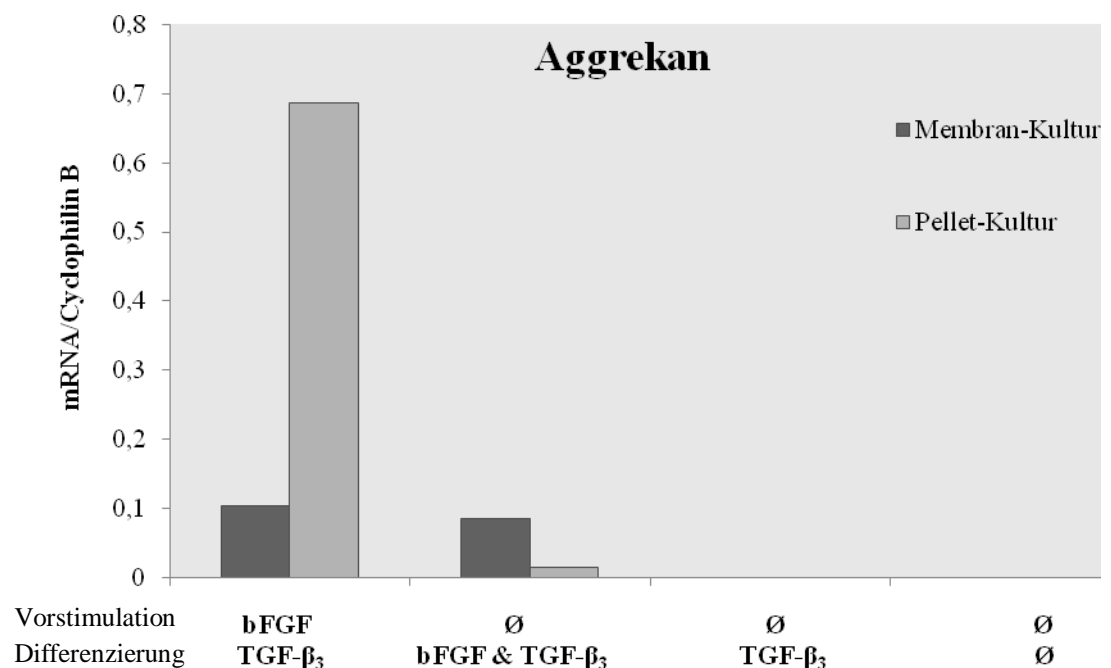


Abb. 20: Relative Quantifizierung von ACAN auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR. Die Expression von ACAN wurde auf die Expression von Cyclophilin B bezogen. Es erfolgte die Vorstimulation mit oder ohne FGF und die Differenzierung zum einen mit TGF- $\beta_3$ , zum anderen mit FGF und TGF- $\beta_3$ .

Die Membran-Kulturen exprimierten ACAN in den folgenden Gruppen:

Die mit FGF vorstimulierten hMSCs, die in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  über 21 Tage differenziert wurden, produzierten sowohl in Membran-Kulturen wie auch in Pellet-Kulturen ACAN. Die Membran-Kultur synthetisierte signifikant weniger ACAN, als die Pellet-Kultur.

Die folgenden Abbildungen 21 und 22 zeigen histologische Nachweise von Proteoglykanen in den Membran-Kulturen und in den Pellet-Kulturen.

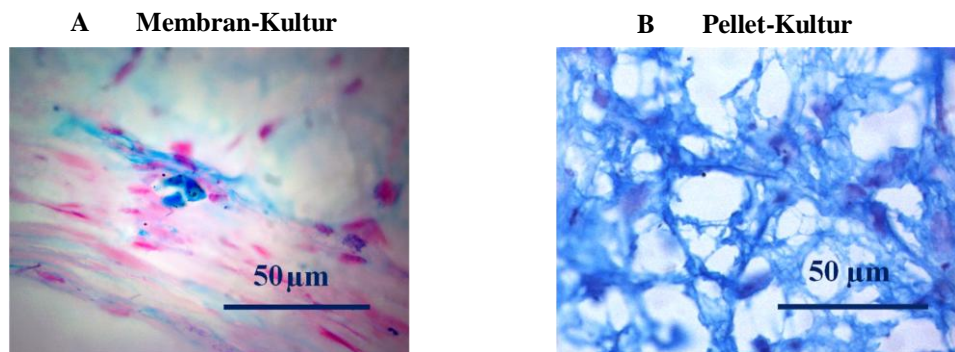


Abb. 21: Histologischer Nachweis von Proteoglykanen in der Membran-Kultur (A) und in der Pellet-Kultur (B), die mit FGF vorstimuliert und in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  differenziert wurden. Alcian Blau Färbung.

Die nicht vorstimulierten hMSCs, die mit beiden Wachstumsfaktoren FGF und TGF- $\beta_3$  in Passage 7 differenziert wurden, synthetisierten in der Membran-Kultur mehr ACAN, als in der Pellet-Kultur. Verglichen mit der mit bFGF vorstimulierten Gruppe produzierte die nicht vorstimulierte Membran-Kultur weniger ACAN.

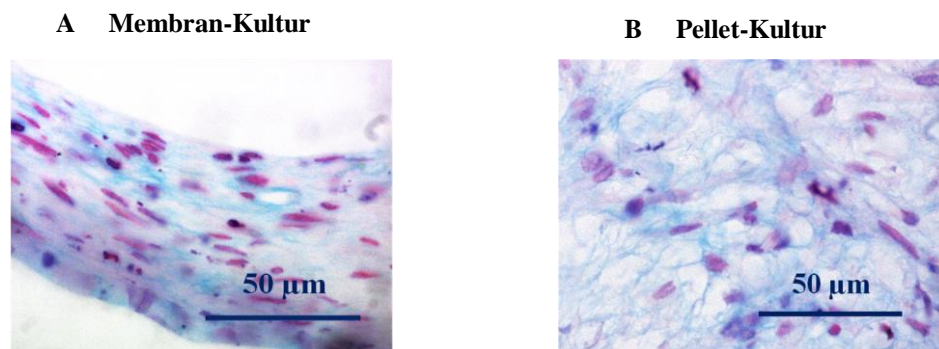


Abb. 22: Histologischer Nachweis von Proteoglykanen in der Membran-Kultur (A) und in der Pellet-Kultur (B), die nicht mit FGF vorstimuliert und in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  und FGF differenziert wurden. Alcian Blau Färbung.

Die nicht vorstimulierten hMSCs, die in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$  differenziert wurden, wiesen kein ACAN sowohl in der Membran-Kultur, als auch in der Pellet-Kultur auf.



Die nicht vorstimulierten hMSCs, die in Passage 7 ohne Wachstumsfaktoren differenziert wurden, wiesen kein ACAN sowohl in der Membran-Kultur, als auch in der Pellet-Kultur auf.

## 2. Expression fibroblastäres Kollagen Typ I

Die Versuche zeigten, in welcher Gruppe die hMSCs in Passage 7, die in Richtung der chondrogenen Linie differenziert wurden, Kollagen Typ I  $\alpha_2$  (COL1A2) exprimierten.

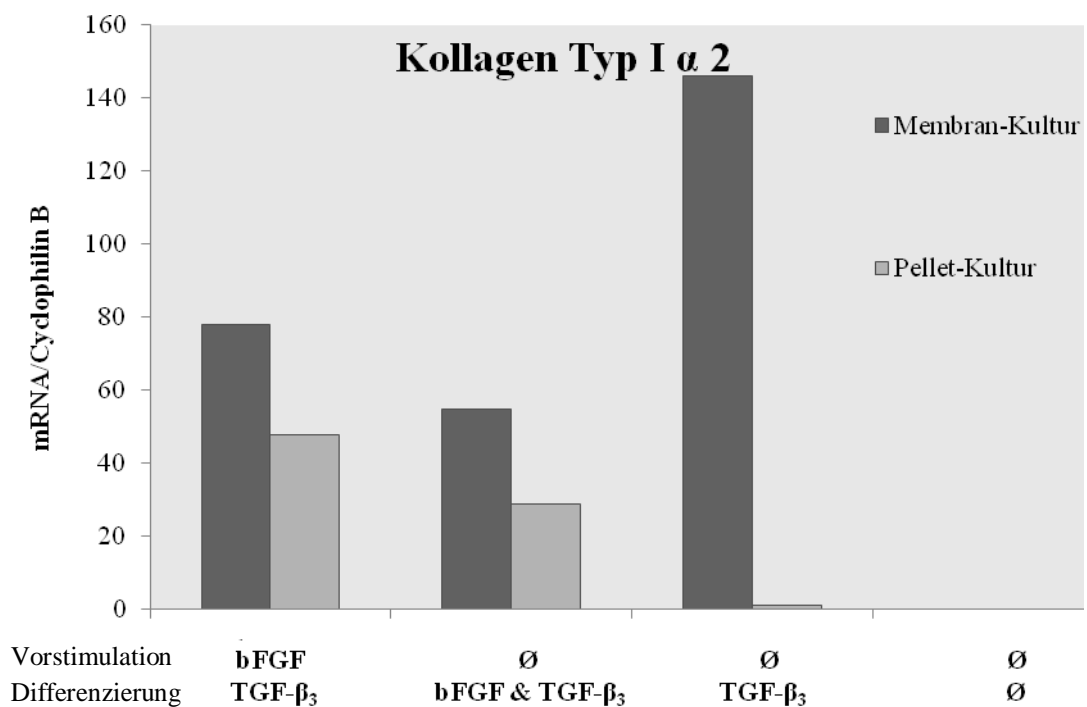


Abb. 23: Relative Quantifizierung von COL1A2 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR  
Die Expression von COL1A2 wurde auf die Expression von Cyclophilin B bezogen.  
Es erfolgte die Vorstimulation mit oder ohne FGF und die Differenzierung zum einen mit TGF- $\beta_3$ , zum anderen mit FGF und TGF- $\beta_3$ .

In Membran-Kulturen produzierten die Kulturen am meisten Kollagen Typ I  $\alpha_2$ , die nicht vorstimuliert und mit TGF- $\beta_3$  differenziert worden waren.

Die Membran-Kulturen, die mit bFGF vorstimuliert und mit TGF- $\beta_3$  differenziert worden waren, produzierten mehr COL1A2, als die vergleichbaren Pellet-Kulturen.

Die Membran-Kulturen, die nicht vorstimuliert und mit TGF- $\beta_3$  differenziert worden waren, produzierten mehr COL1A2, als die vergleichbaren Pellet-Kulturen.

Die Kontrollgruppen, in denen hMSCs nicht vorstimuliert wurden und die ohne Wachstumsfaktoren in Passage 7 differenziert wurden, exprimierten kein COL1A2.

### 3. Expression des Hypertrophiemarkers Kollagen Typ X

Es konnte gezeigt werden, in welcher Gruppe die hMSCs in Passage 7, die in Richtung der chondrogenen Linie differenziert wurden, Kollagen Typ X  $\alpha_1$  (COL10A1) synthetisierten.

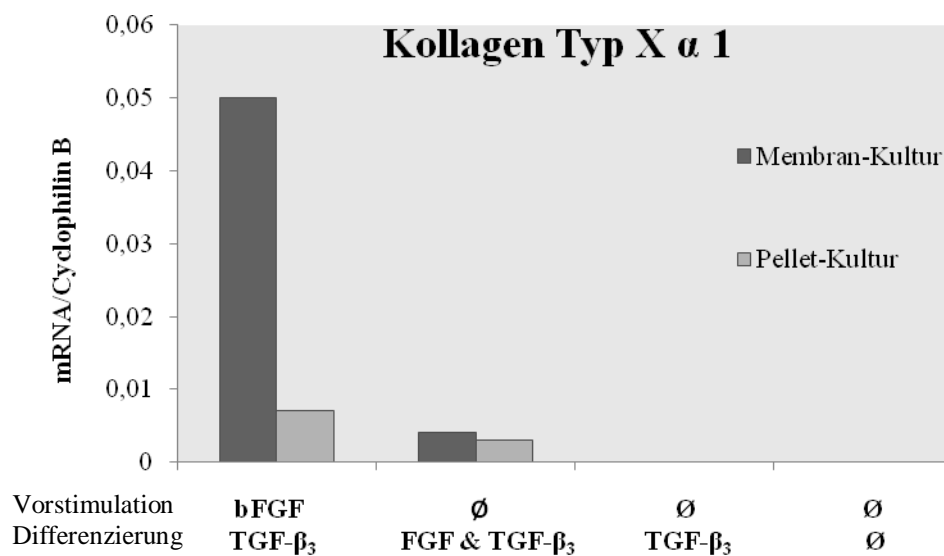


Abb. 24: Relative Quantifizierung von COL10A1 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR. Die Expression von COL10A1 wurde auf die Expression von Cyclophilin B bezogen. Es erfolgte die Vorstimulation mit oder ohne FGF und die Differenzierung zum einen mit TGF- $\beta_3$ , zum anderen mit FGF und TGF- $\beta_3$ .

Die mit FGF vorstimulierten hMSCs, die mit TGF- $\beta_3$  differenziert wurden, wiesen eine höhere Expression von COL10A1 in der Membran-Kultur, als in der Pellet-Kultur auf.

Die nicht mit FGF vorstimulierten hMSCs, die mit TGF- $\beta_3$  und FGF differenziert worden waren, wiesen nahezu die gleiche Expression von COL10A1 in der Membran-Kultur und in der Pellet-Kultur auf. Diese Membran-Kulturen synthetisierten weniger COL10A1, als die mit FGF vorstimulierten Membran-Kulturen.

Die nicht mit FGF vorstimulierten hMSCs, die nur mit TGF- $\beta_3$  differenziert worden waren, exprimierten sowohl in der Membran-Kultur, als auch in der Pellet-Kultur kein COL10A1.

## IV Diskussion

### 1. Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen

Knochenbildende Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer Ratte wurden erstmals 1968 beschrieben (Friedenstein et al. 1968). Caplan bezeichnete eine Bindegewebsvorläuferzelle als *mesenchymale* Stammzelle (MSC), die Bestandteil des Knochenmarkstromas ist und daraus isoliert werden kann (Caplan 1991, 1994).

Abb. 25 zeigt das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen.

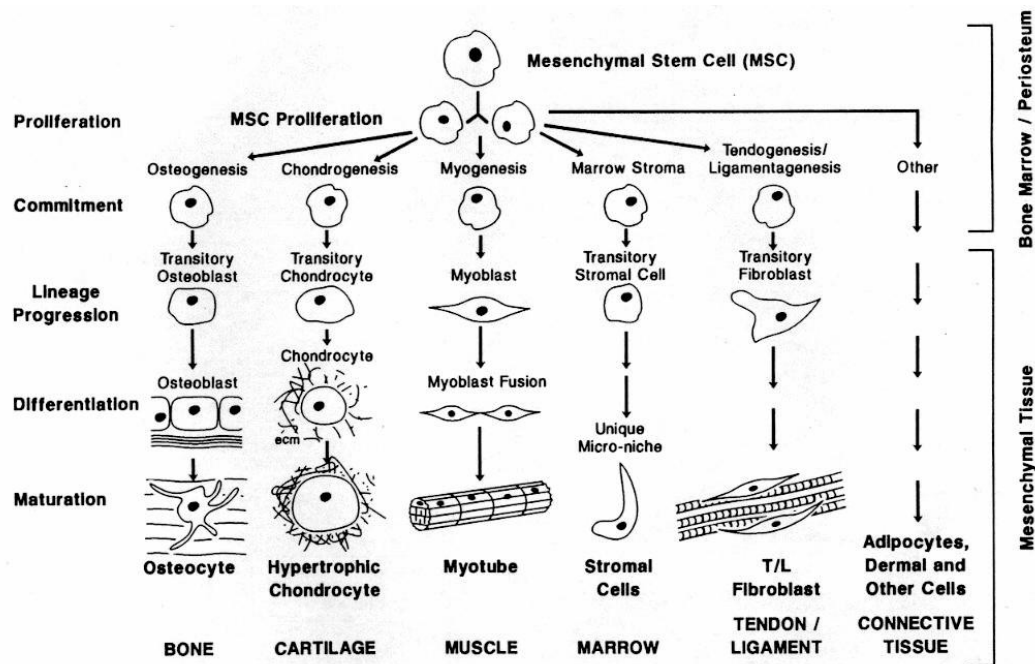


Abb. 25: Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen (Caplan 1994)

Aufgrund ihrer Multipotenz kommen adulte humane mesenchymale Stammzellen (Friedenstein et al. 1976; Pittenger et al. 1999) für die Proliferations- und chondrogene Differenzierungsabläufe analysierenden *in-vitro*-Versuche als zelluläres Differenzierungsmodell in Frage (Bruder et al. 1998; Li et al. 2004). Das chondrogene Potential von MSCs konnte durch die *in-vitro*-Differenzierung von MSCs in die chondrogene Richtung unter dem Einfluss verschiedener Faktoren gezeigt werden (Pittenger et al. 1999; Caplan u. Bruder 2001; Ji et al. 2009; Lee et al. 2004).

Als *Zelldifferenzierung* wird eine Spezialisierung der Zellfunktion bezeichnet. Dabei finden Differenzierungsprozesse in einer undifferenzierten Zelle statt, die mit Veränderungen der Zellstrukturen einhergehen. Anschließend kann die differenzierte Zelle nur

bestimmte Funktionen durchführen, dafür aber mit größerer Leistung (Junqueira et al. 1996). So entsteht bei der chondrogenen Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle ein Chondrozyt, dessen Funktion darin besteht, die Bestandteile der eigenen extrazellulären Matrix, vor allem Proteoglykane und Kollagen Typ II, in großen Mengen zu synthetisieren. Aus diesen wird das Knorpelgewebe aufgebaut, dessen biomechanische Eigenschaften die Stützfunktion ermöglichen.

Unterschiedliche Faktoren, die in Abb. 26 links von der schematischen Zelle zu sehen sind, induzieren den Differenzierungsprozess von Zellen in eine im Bereich der Multipotenz liegende Richtung und steuern ihn während des ganzen Ablaufs.

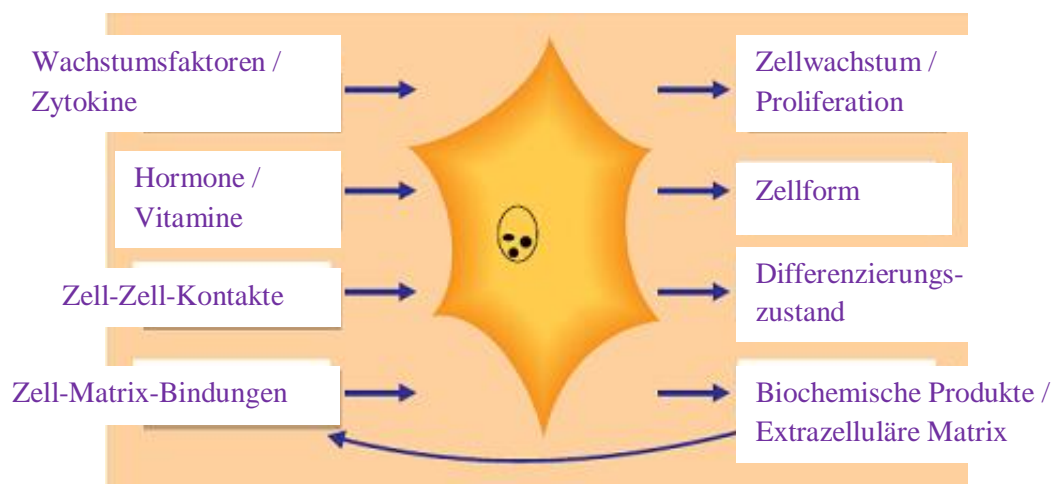


Abb. 26: Faktoren der Zelldifferenzierung (Franke 1995)

Während der Chondrogenese *in vivo* migrieren mesenchymale Stammzellen zu Orten des künftigen embryonalen Skeletts. In diesen Ansammlungen vermehren sich die MSCs und differenzieren sich zu Chondrozyten. Diese Prozesse werden reguliert, indem MSCs einerseits durch die Zell-Zell-Kontakte miteinander agieren, andererseits parakrin durch die Wachstumsfaktoren, die sie selbst synthetisieren und in die Umgebung sezernieren und die Differenzierung benachbarter Zellen beeinflussen. Außerdem wirken Wachstumsfaktoren auf MSCs autokrin und steuern die Differenzierung der eigenen Zelle. Zudem erfolgt die rückkoppelnde Steuerung der Differenzierung über die Rezeptoren der Zelle durch Moleküle der extrazellulären Matrix, die von den Zellen synthetisiert und sezerniert wurden (Solursh et al. 1989; Philp et al. 2005). Hormone und Vitamine nehmen auch an den Differenzierungsprozessen teil.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Differenzierungsleistung von MSCs (Poole 1991), sich *in vitro* in Richtung der chondrogenen Linie zu entwickeln (Johnstone et al. 1998), sondern auch die Ausbildung der extrazellulären Matrix (knorpelähnliche

organoide Struktur) durch die entstehenden Zell-Zell-Interaktionen während der spontanen Bildung von dreidimensionalen Zellaggregaten *in vitro* (Moscona 1961) gesteigert werden (Kaps et al. 2004).

Außerdem wird der *in-vitro*-Differenzierungsprozess dadurch gefördert, dass zum Nährmedium die Differenzierung induzierende Faktoren gegeben werden, nämlich, zum einen physiologische Faktoren, wie Wachstumsfaktoren (z. B. der transformierende Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ ), Hormone (z. B. Hydrokortison), Vitamine (z. B. Vitamin D) und anorganische Ionen (z. B. Selen), zum anderen nicht physiologische Faktoren (z. B. Dimethylsulfoxid).

Darüber hinaus müssen bestimmte Bedingungen im Brutschrank vorkommen, unter denen die MSCs *in vitro* wachsen und sich chondrogen differenzieren können, nämlich, Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub>- sowie O<sub>2</sub>-Gehalt.

### **1.2 *In-vitro*-Herstellung künstlichen suffizienten Knorpelgewebes**

Eine suffiziente *in-vitro*-Chondrogenese aus MSCs konnte bis heute trotz intensiver Bemühungen nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Darauf weisen folgende Untersuchungsergebnisse der in Richtung der chondrogenen Linie differenzierten MSCs hin. Die hochregulierte Expression von fibroblastenspezifischem Kollagen Typ I, hochregulierte Expression von Hypertrophie-typischem Kollagen Typ X, unterregulierte Expression von knorpeltypischem Kollagen Typ II führen zum Aufbau einer insuffizienten Matrix, weswegen ein biomechanisch nicht stützfähiges Gewebe entsteht.

Eine *in-vitro*-Rekonstruktion der spezialisierten Zellen und ihre Interaktionen im Gewebe, entsprechend der *in-vivo*-Situation, ist bis heute nicht erreicht worden. Man versucht die nur teilweise entschlüsselten Mechanismen der *in-vivo*-Chondrogenese (Cancedda et al. 1995; Maleski et al. 1996) in die *in-vitro*-Differenzierung von MSCs zu implementieren.

### **1.3 *In-vitro*-Differenzierung von MSCs in dreidimensionalen (3D)-Zellkulturen**

MSCs können sich in Richtung der chondrogenen Linie (Solchaga et al. 1999; Adkisson et al. 2001) unter 3D-Kulturbedingungen *in vitro* differenzieren (Matsuda et al. 2005; Tortelli und Cancedda 2009). Für 3D-Kulturen gibt es verschiedene Techniken.

Zum einen werden MSCs zur Differenzierung vorübergehend in bzw. auf eine dreidimensionale Trägerstruktur (engl. *scaffold*) gebracht. Zur Herstellung dieser Trägerstruk-

turen werden degradierbare, biokompaktile, allergenfreie und nicht zytotoxische Werkstoffe benötigt (Ratner 1996). Zudem dürfen die Abbauprodukte keinen Entzündungsreiz und somit keine Abstoßreaktion, sowie keine Wundheilungsstörungen auslösen. Darüber hinaus dürfen sie keinen negativen Einfluss auf das Differenzierungspotential von MSCs haben.

Die Auswirkungen von unterschiedlichen Materialien auf MSCs wird erforscht (Jäger et al. 2002; Neuß-Stein 2004). So zeigte sich zum Beispiel, dass degradierbares Fibrin für hMSCs günstige Proliferation- und Adhärenzbedingungen schafft (Bensaid et al. 2003). Bei der Evaluation von Biowerkstoffen durch Progenitorzellen mit chondrogenem Potential zeigten sowohl synthetische Werkstoffe wie Polylactid-Caprolacton (LAICL), Polyvinyl (PVF) (Aung et al. 2002), D, D-L, L-Polylacid (Nöth et al. 2002), als auch natürliche Materialien wie Alginat (Bonaventure et al. 1994; Weber et al. 2002), Hyaluronsäure (Butnariu-Ephrat et al. 1996), Kollagen (Wakitani et al. 1998) als Trägermatrixes chondrogene Potenz. Die Untersuchungen von physikalischen Matrix-Eigenschaften zeigten einen Einfluss der Elastizität der Matrix auf die *in-vitro*-Differenzierung von MSCs (Engler et al. 2007).

Schwierigkeiten treten beim Einpflanzen der Zellen in eine 3D-Trägerstruktur und bei ihrer Verknüpfung mit nativem Knorpel auf. Außerdem wirken ihre Abbauprodukte auf den Knorpel (Hegewald 2006). Statt einer Gleichbesiedelung platzieren sich die Zellen in oberflächliche Schichten der 3D-Trägerstruktur. Dadurch werden Zell-Zell-Kontakte in 3D-Trägerstrukturen erschwert, die die Differenzierung einleiten. Im Zentrum einer 3D-Trägerstruktur wird die Entstehung von Gewebe dadurch verhindert, dass nicht viele Zellen ins Zentrum der 3D-Trägerstruktur migrieren. Außerdem sind die Ernährung von zentral gelegenen Zellen und der Abtransport ihrer Stoffwechselprodukte aus dem Zentrum einer 3D-Trägerstruktur reduziert. Die Qualität des Transplantates wird dadurch verschlechtert. Darüber hinaus besteht eine erhöhte Empfindlichkeit von MSCs gegen einen mechanischen Reiz bei der Zellaussaat auf eine Trägermatrix mit Auslösung metabolischer Zelldysfunktionen (Domm et al. 2000), wodurch die Zelldifferenzierung negativ beeinflusst werden kann.

Gegenüber der Kultivierung in einer 3D-Trägerstruktur stellt die trägerfreie hochdichte Zellkultivierung bessere Bedingungen für mesenchymale Stammzellen und deren chondrogene *in-vitro*-Differenzierung zur Herstellung eines Transplantates zur Verfügung.

Beim Einsatz hochdichter Kultur wird eine große Anzahl an MSCs durch Zentrifugation der Zellsuspension in Kontakt gebracht. Diese Sedimentation von MSCs ähnelt dem *in-vivo*-Prozess der *Kondensation* von MSCs (Thorogood und Hinchliffe 1975; Poole 1991). Bei der *Kondensation* von MSCs in der Embryogenese handelt es sich um eine Ansammlung mesenchymaler Stammzellen an spezifischen Stellen des künftigen embryonalen Skelettes. Dabei entwickeln MSCs Kontakte untereinander, agieren, proliferieren und differenzieren sich zu Chondrozyten (Yang et al. 2009). Diese Zellinteraktionen regulieren die Chondrogenese in der embryonalen Entwicklung (Maleski et al. 1996; Toole 2001).

Die Zellinteraktionen fördern die *in-vitro*-Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (Thorogood et al. 1975; Poole 1991; Zimmermann et al. 1990; Li et al. 2004), als auch die Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten (Koch und Gorti 2002).

Die rückkoppelnde Regulation der *in-vivo*-Differenzierung von MSCs erfolgt durch die Interaktionen extrazellulärer Matrixmoleküle (ECM) über Zellrezeptoren (*Integrine*) (Häusler et al. 2002), deren zytoplasmatische Domänen mit Signaltransduktions- und Zytoskelettproteinen interagieren (Hynes 1992). Dadurch werden Adhäsion, Migration, als auch die Differenzierung von Chondrozyten reguliert (Solursh 1991; Cancedda 1995; Hynes 2002). So führt eine Blockade der Zell-ECM-Komponenten-Interaktionen sowohl zu einer geringeren Zellproliferation in Pellet-Suspensionskulturen (Enomoto-Iwamoto et al. 1997), als auch zur Inhibition des Wachstums (Hirsch et al. 1997) und der Zellmigration (Aszodi et al. 2003).

Außerdem wird der Ablauf der molekularen Steuerung der *in-vitro*-Differenzierung von MSCs in hochdichten Zellkulturen begünstigt. Die molekulare Steuerung der chondrogenen Differenzierung von MSCs *in vivo* erfolgt durch parakrine Signale unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Hormone (Vortkamp 2003).

Darüber hinaus ist eine gleichmäßige Ansiedelung der Zellen in hochdichten Zellkulturen im Gegensatz zur ungleichmäßigen Zellbesiedelung von 3D-Trägerstrukturen möglich.

Die *in-vitro*-Differenzierung von MSCs in Richtung der chondrogenen Linie in trägerfreien hochdichten Zellkulturen liefert auch Erkenntnisse, welche Unterschiede bei der

Ausbildung von Knorpelgewebe eine Rolle spielen, wie z. B. die Zellenart, Technik der Kultur und die Anzahl der Zellpassagen.

Heutzutage sind mehrere Techniken trägerfreier hochdichter 3D-Kulturen entwickelt worden. Dazu gehören sowohl die Pellet-Kultur (Johnstone et al. 1998), das Transwell-System (Corning Incorporated, Schiphol-Rijk, Holland), in denen MSCs unter statischen Konditionen differenziert werden (Maeda et al. 2010), als auch die Rotationskultur (Furukawa et al. 2007), in der MSCs unter dynamischen Konditionen differenziert werden.

## **2. Vergleich zweier trägerfreier 3D-Kultursysteme bei der chondrogenen Differenzierung von hMSCs**

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei statische hochdichte Kultursysteme, die Pellet-(PK) und die Membran-Kultur (MK), verglichen. Es wurde das chondrogene Potential von hMSCs bei hoher Zelldichte einerseits in flüssigem Nährmedium (PK), andererseits an der Grenze zwischen Luft und Nährmedium (MK) untersucht.

Die Pellet-Kultur (Johnstone et al. 1998) ist eine etablierte Kulturform für die Untersuchungen der chondrogenen *in-vitro*-Differenzierung von MSCs im Medium (Mackay et al. 1998).

Für die *in-vitro*-Zelldifferenzierung an einer Luft-Medium-Interphase existieren verschiedene Techniken der Kultivierung an Grenzen zwischen flüssigem Medium und Atmosphäre (*Air-Lift*-Kulturen).

Die Technik der Membran-Kultur wurde von Fell bereits 1928 beschrieben und im Verlauf der Zeit modifiziert (Fell und Robison 1929). Nach der Modifikation durch Trowell, der sie als *Organ culture* bezeichnete (Trowell 1954), wird sie bis heute angewendet. So wurde sie für die Kultivierung von adulten Chondrozyten etabliert (Schulze-Tanzil et al. 2002). Die Membran-Kultur, als Differenzierungsmodell an der Luft-Medium-*Interphase*, hat gegenüber der Pellet-Kultur folgende Vorteile:

a) Die Ausbildung eines eigenen Milieus, so dass die Konzentration der eigenen produzierten Wachstumsfaktoren innerhalb des Zellpellets durch das Medium nicht verdünnt



wird. Dies könnte zur verbesserten Konditionierung des Milieus im sich entwickelnden Gewebe und zur Differenzierung der MSCs beitragen.

b) Zudem wirkt der niedrige Sauerstoffpartialdruck im Zentrum des Zellpellets positiv nicht nur auf die Redifferenzierung von Chondrozyten (Trowell 1954; Domm et al. 2002), sondern auch auf die Differenzierung von MSCs (Markway et al. 2009).

## 2.1 Einfluss von Sauerstoff auf die chondrogene Differenzierung

Molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ist Oxidationsmittel und wird für die Oxidationsreaktionen, bei denen Energie für biochemische Reaktionen produziert wird, im Organismus benötigt.

Hyaliner Knorpel hat einen niedrigen Sauerstoffgehalt (Brighton et al. 1971; Lane et al. 1977; Grimshaw et al. 2000). Die Sauerstoffkonzentration ist für die Aufrechterhaltung des chondrozytären *Phänotyps* verantwortlich. Bei der Dedifferenzierung von Chondrozyten liegt ein normaler Sauerstoffgehalt und bei ihrer Redifferenzierung ein niedrigerer Sauerstoffgehalt *in vitro* vor (Domm et al. 2002; Xu et al. 2007).

Die Chondrogenese während der embryonalen Skelettentwicklung erfolgt in einer Mikroumgebung, die nur 1 % Sauerstoff enthält (Brighton et al. 1971). Wohingegen die *in vitro*-Chondrogenese erfolgreicher bei einer Sauerstoffkonzentration von 10 % – 15 % erfolgt (O'Driscoll et al. 1997; Grimshaw und Mason 2000).

Bei den Pellet-Kulturen befand sich das Pellet im flüssigen Medium, in das aufgrund der niedrigen Löslichkeit wenig Sauerstoff aus der Gasphase (Luft) diffundierte. Die in der Pellet-Kultur differenzierten hMSCs synthetisierten knorpelspezifische Marker, wie Kollagen Typ II und Aggrekan, die auf mRNA-Ebene sowie histologisch nachgewiesen werden konnten (Ringe 2006; Slobodianski 2006).

In der Membran-Kultur herrschte ein niedriger Sauerstoffgehalt im Zentrum des hochdichten Zellpellets (Trowell 1954). Die Oberfläche der Pellets kontaktierte jedoch die Luft. Deswegen geht unsere Arbeitsgruppe davon aus, dass der atmosphärische Sauerstoff auf die Differenzierung von hMSCs hier eine Wirkung entfalten konnte. Die Luftphase (*Atmosphäre*) besteht aus 21 % Sauerstoff, 20 % Stickstoff, sowie aus geringen Mengen anderer Gasen. Die atmosphärische Sauerstoffkonzentration könnte die Differenzierung von hMSCs somit an der Oberfläche negativ beeinflusst haben. Die Bildung von Kollagen und der Zellmetabolismus im Knorpelgewebe werden durch die entstehenden freien Radikale (Malda et al. 2003) aufgrund der hohen Sauerstoffkonzentration

on (z. B. 90 %) gehemmt (Lane et al. 1977; O`Driscoll et al. 1997; Lee und Urban 2002).

In Bezug auf die Sauerstoffkonditionen waren die Bedingungen in der Pellet-Kultur für die Differenzierung von MSCs wahrscheinlich besser geeignet, als in der Membran-Kultur.

## 2.2 Material des Zellträgers

Im Unterschied zur Pellet-Kultur kommen MSCs mit dem Werkstoff der sie tragenden Unterlage in der Membran-Kultur in Kontakt. Diese Zellunterlage, eine poröse Membran, trennt die flüssige Phase (Nährmedium) und die gasförmige Phase (Atmosphäre).

Da das extrazelluläre Milieu die Entwicklungsfähigkeit von MSCs bestimmt (Watt u. Hogan 2000), stellt der Werkstoff dieser Membran, *Substratum* (Engler et al. 2007) für die MSCs eine Matrix dar. Wie am Anfang erwähnt wurde, interagieren auch Moleküle der ECM über ihre Rezeptoren mit einer Zelle und steuern zelluläre Prozesse *in vivo*, wie Proliferation und Differenzierung. Die ECM stellt eine natürliche Trägerstruktur für die Zellen dar, in der sie wachsen, sich differenzieren und ihre Funktionen erfüllen. In der Membran-Kultur erfolgen die Zellproliferation sowie die Differenzierung auf der Oberfläche der Membran. Die Eigenschaften der Membran beeinflussen die Differenzierung der MSCs über die Elastizität der Membran (Engler et al. 2007).

Die Elastizität eines Stoffes beeinflusst die Differenzierung von hMSCs, wobei die das Gehirn imitierende weiche Matrix neurogen wirkt, während rigide Matrix osteogene Auswirkungen auf MSCs hat (Engler et al. 2007).

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Membranfilter aus *Zelluloseacetat* als Unterlage für das Zellpellet verwendet. *Zelluloseacetat* ist ein Naturstoff aus modifizierter *Zellulose* und hat folgende Eigenschaften: Möglichkeit für hohe Durchflussraten und thermische Stabilität mit geringer Adsorption.

In dieser Studie konnte in Membran-Kulturen lediglich eine Aggrekan-Expression nachgewiesen werden, was auf eine beginnende Differenzierung der hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie schließen lässt. Im Gegensatz zur Pellet-Kultur deutet die fehlende Expression vom knorpelspezifischen Kollagen Typ II, jedoch auf einen nicht erfolgten Abschluss der Differenzierung der hMSCs in der Membran-Kultur hin.

Das Biomaterial *Zelluloseacetat* wurde bereits für die Zelldifferenzierungen eingesetzt (Nogami et al. 1978; Hanamura et al. 1978; Sato et al. 2005; Han et al. 2006). Das Potential von 3D-Trägerstrukturen aus *Zelluloseacetat* wurde in Kulturen aus funktionalen

Kardiomyozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass *Zelluloseacetat* das Wachstum von Zellen induzierte und die Bildung von Zell-Zell-Kontakten, sowie die elektrische Funktionalität förderte (Entcheva et al. 2004). Die Porosität und Semipermeabilität des Stoffes *Zelluloseacetat* sind ähnlich wie die Funktion von Venen und Arterien (Ye et al. 2007). Zellwachstum auf einem Kopolymer aus *Zelluloseacetat* und *Zellulosenitrat* erhöhte die Migrationsrate von Osteoprogenitorzellen (Takata et al. 2001). Außerdem konnte die Differenzierung von Bindegewebezellen auf einer Membran aus *Zelluloseacetat* unter dem Einfluss von *bone morphogenetic protein* (BMP) zu Chondrozyten durchgeführt werden. Dies konnte anhand des Nachweises der biosynthetischen Aktivität der differenzierten Zellen, Glykoseaminoglykane zu synthetisieren, festgestellt werden (Takahashi et al. 1986).

Außer *Zelluloseacetat* wurde auch *Zellulosenitrat* zur chondrogenen Differenzierung von MSCs verwendet. Zimmermann nutzte einen Membranfilter aus *Zellulosenitrat* (Sartorius, Göttingen, F.R.G.; SM 11307, Porendurchmesser 0,2 µm) für die Differenzierung von MSC zu Chondrozyten in Organoid-Kulturen (Zimmermann et al. 1988, 1990).

Es gibt auch andere Werkstoffe, aus denen Membranfilter für Zellkulturen hergestellt werden, wie z. B. *Polyethylenterephthalat* (PET) (ThinCert Plate, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) und *Polycarbonate* (Transwell, Corning Incorporated, Amsterdam, Holland).

In dieser Studie konnte keine chondrogene Differenzierung von hMSCs auf einem Zelluloseacetatfilter abgeschlossen werden. Es ist jedoch fraglich, in wie weit das Biomaterial Zelluloseacetat dabei eine Rolle gespielt hat.

Während die ganze Oberfläche des Pellets in der Pellet-Kultur mit dem Medium direkt kontaktiert, befindet sich das Zellpellet in der Membran-Kultur auf einer Membran, deren Eigenschaften, wie Material, Porendurchmesser, Porendichte und Porenform die Durchflussrate bestimmen.

Die Diffusion von Partikeln durch eine poröse Membran wird als „Permeabilität“ bezeichnet. Da bei der Zellkultivierung eine hohe Permeabilität zweckmäßig ist, ist eine geringe Dicke der homogenen porösen Membran erforderlich.

Die in letzter Zeit entwickelten nanoporösen Membranmaterialien haben durch eine dünne Membran im Mikrometer-Bereich hohe Durchflussraten, deswegen können sie für die Zellkultivierung im Bereich Tissue Engineering verwendet werden. Als „nanoporöse Materialien“ werden schaumartige Stoffe aus Keramik, Metall oder Kunststoff,

mit einer großen Anzahl von Nanometer großen Poren bezeichnet. Material sowie Herstellungsmethode bestimmen den Durchmesser der Poren (Kosinska et al. 2004) und somit die Durchflussrate des Membranfilters.

Unser Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  und mit einer Dicke von 120  $\mu\text{m}$  ist theoretisch zur Zellkultivierung sowie -differenzierung anwendbar, da Wachstumsfaktoren (Größe: TGF- $\beta$  13 kDa, FGF 16-22 kDa) und andere Medienzusätze durch die Poren zu den Zellen passieren können (Zimmermann et al. 1988).

Zudem kann man es an der entfalteten Wirkung auf hMSCs in der vorliegenden Arbeit erkennen, da die hMSCs über die dreiwöchige *in-vitro*-Kultivierung nicht nur lebensfähig blieben, sondern auch Schritte bei der Differenzierung in Richtung der chondrogenen Linie durchliefen. Sie sind in der Membran-Kultur synthesefähig geworden, was sich auf die nachgewiesene knorpelspezifische Aggrekanexpression zurückführen lässt. Dennoch verlief die chondrogene Differenzierung nicht so erfolgreich wie in der Pellet-Kultur, da Membran-Kulturen kein Kollagen Typ II exprimierten.

Daraus lässt sich schließen, dass die Permeabilität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Membranfilters ausreicht, um Zellen mit den erforderlichen Nährstoffen zu versorgen. Ein Rückschluss auf das Differenzierungsverhalten der hMSCs ist jedoch nicht möglich.

Ein Membranfilter mit denselben Parametern wurde auch in der Organ-Kultur bei der Kultivierung von Chondrozyten angewendet (Zimmermann et al. 1988, 1990).

In der Literatur finden sich verschiedene Membranfilter mit Porendurchmessern von 0,4  $\mu\text{m}$  und 1,0  $\mu\text{m}$  bei einer Filterdicke von 10  $\mu\text{m}$  (*Applikation Guideline, Greiner Bio-One*). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Membran-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$  und einer Filterdicke von 120  $\mu\text{m}$  verwendet. Ein größerer Porendurchmesser führt zu einer verbesserten Durchflussrate (Klinke et al. 2005, Gesetz Hegen-Poiseuille).

Außerdem beeinflusst die Filterdicke die Durchflussrate, da sie durch eine Verdopplung der Filterdicke halbiert wird (Gesetz Hegen-Poiseuille). Deswegen erlaubt eine Filterdicke von 10  $\mu\text{m}$  einen besseren Durchfluss, als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Filterdicke von 120  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend kann man vermuten, dass der in dieser Arbeit verwendete Membranfilter aus *Zelluloseacetat* die Kultivierung ermöglicht, aber Membranfilter mit einem größeren Porendurchmesser und dünnerer Filterdicke für die Kultivierung geeigneter sind, da sie zu besseren Durchflussraten beitragen.

### 2.3 Einfluss des Metallträgers

Das Gitter aus nichtrostendem Stahl V4A der Sorte 1.4401 wurde als tragender Bauteil in der Membran-Kultur verwendet. Dieser nichtrostende Stahl enthält überwiegend Eisen und die Korrosionsbeständigkeit verbessernde Elemente, nämlich 18 % Chrom, 10 % Nickel, 2 % Molybdän, 0,07 % Kohlenstoff und 0,11 % Stickstoff. Nichtrostender Edelstahl V4A gilt als korrosionsbeständig gegenüber Wasser. Unter der Korrosionsbeständigkeit versteht man die Vermeidung von Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium. Die Korrosionsbeständigkeit beruht auf einer selbst gebildeten chromreichen Oxidschicht bei ausreichender Sauerstoffmenge. Die Dicke dieser Barrierschicht beträgt 1-2 nm und vermindert den Metallaustrag des Stahles ins Medium.

Der Stahl V4A mit hoher Korrosionsbeständigkeit wird als temporärer Implantatstoff verwendet und trägt somit wahrscheinlich nur in geringem Maße zu einer Zellschädigung bei.

### 2.4 Einfluss des hydrostatischen Drucks

Mechanische Kräfte regulieren biologische Prozesse sowohl auf Gewebe-, als auch auf Zellebene. Die Entwicklung mesenchymaler Gewebe wird durch die mechanische Belastung und abhängig von ihrer Art in eine bestimmte Differenzierungslinie gelenkt.

*In vivo* wurde der Einfluss des hydrostatischen Drucks auf Zelldifferenzierungen und auf ihre Synthesefunktion beobachtet. Knorpelzellen reagieren auf die Veränderung hydrostatischen Drucks und auf Scherkräfte. Auf den hydrostatischen Druck entstehen volumetrische Spannungen an Zellen, auf Torsionsspannung entstehen Torsionskräfte (Pauwels 1980). Pauwels stellte eine Theorie darüber auf, dass hydrostatischer Druck die chondrogene Differenzierung begünstigt. Auch die endochondrale Ossifikation erfolgt unter komprimierendem Druck von 0,15 MPa (Claes et al. 1999).

Mechanische Faktoren spielen bei der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten eine Rolle (Smith et al. 2000; Matsuda et al. 2003; Jung et al. 2008; Furukawa et al. 2008). Sie unterstützen die chondrogene Differenzierung von Stammzellen und führten zur Ausbildung von qualitativ hochwertigen Gewebe (Schumann et al. 2006). Die Entstehung eines druckelastischen Knorpelgewebestücks wird dadurch erreicht, dass eine gewebespezifische mechanische Stimulation das entstehende Gewebe konditioniert (Altman et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit betrug der komprimierende Druck im Röhrchen der Pellet-Kultur 98,10 Pa. Der hydrostatische Druck wurde nach dem Pascalschen Gesetz be-

rechnet:  $p(h) = p * g * h$ : hydrostatischer Druck als Funktion der Wasserhöhe ( $p(h)$ ) -  $p = \text{Pa}$ ; Erdschwerebeschleunigung ( $g$ ) -  $9,81 \text{ m/s}^2$ ; Wasserdichte ( $\rho$ ) -  $1000 \text{ kg/m}^3$ ; Höhe der Flüssigkeitssäule ( $h$ ) -  $0,01 \text{ m}$ .

Die chondrogene Differenzierung von hMSCs lief unter diesen Bedingungen erfolgreicher. Dass der gering komprimierende Druck in Pellet-Kulturen zur chondrogenen Differenzierung hätte beitragen können, lässt sich zwar nicht widerlegen, ist jedoch sehr fraglich.

## 2.5 Einfluss der Zellpassage

Eine Zunahme der Zellpassagen geht bei hMSCs mit der Abnahme des Differenzierungspotentials der Zellen einher. Dieses Phänomen des Verlustes des Differenzierungspotentials ist durch Zellalterung, *Seneszenz*, bedingt (Pazolli et al. 2008). Sie wurde als *Hayflick limit* bezeichnetes Phänomen beschrieben (Hayflick und Moorhead 1961). Das Merkmal der Zellalterung ist, wenn Zellen selbst unter mitosestimulierenden Faktoren nicht mehr fähig sind, sich zu teilen. Eine der Hypothesen der Ursache stellt die Kürzung der Chromosomen mit der Zahl der Replikationen der DNA dar (Allsopp et al. 1992), die mit der Zellalterung korreliert, die *replikative Seneszenz* (Hayflick 1985; Bodnar et al. 1998). Hierbei entstehen biochemische sowie physiologische Modifikationen von DNA (Kil et al. 2006) und dem intrazellulären Transport (Benvenuti et al. 2002). Das Differenzierungspotential von MSCs verringert sich mit jeder weiteren Passage. MSCs weisen ab der fünften Passage eine reduzierte Differenzierbarkeit *in vitro* auf (Pittenger et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden hMSC der siebten Zellpassage in zwei Kultursystemen in Richtung der chondrogenen Linie differenziert. Dabei zeigte sich, dass die Pellet-Kulturen beide knorpelspezifische Markermoleküle Kollagen Typ II und Aggrekan exprimierten, währenddessen exprimierte die Membran-Kultur nur Aggrekan.

Damit konnte gezeigt werden, dass hMSCs in der siebten Passage noch in der Lage sind, in Richtung der chondrogenen Linie *in vitro* in hochdichten Kulturen differenziert zu werden. Die erfolgreichere chondrogene Differenzierung von hMSCs ist in niedrigeren Passagen hochdichter Kulturen zu erwarten. So exprimierten die in Richtung der chondrogenen Linie differenzierten hMSCs in Passage fünf COL2A1 in der Pellet Kultur stärker, als in der Membran-Kultur (Wagner-Mayer et al. 2010).

## 2.6 Einfluss von Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Signalmoleküle, bei denen es sich um Proteine handelt. Der Wirkmechanismus von Wachstumsfaktoren wird über Rezeptoren aus dem extrazellulären Raum durch die Aktivierung einer Kaskade von intrazellulären Proteinen in den Zellkern übertragen (Baird und Böhlen 1985; Zurfluh et al. 1990). Hier werden bestimmte Gene aktiviert und Abläufe wie die Chondrogenese geregelt. Über die intrazellulären Proteine eines Signalweges beeinflussen sie sich gegenseitig entweder synergistisch oder antagonistisch.

Wachstumsfaktoren werden bei der *in-vivo*-Chondrogenese durch MSCs selbst synthetisiert. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, regeln die von MSCs synthetisierten unterschiedlichen Wachstumsfaktoren die chondrogene *in-vivo*-Differenzierung von MSCs. FGF induziert sowohl die Zellteilung als auch die Vaskularisation (Baird 1994). Für die Chondrogenese sind u.a. FGF (Ornitz et al. 2002) und TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren entscheidend (Mehlhorn et al. 2006; Lorda-Diez et al. 2009). Während FGF das Zellwachstum steuert und somit die MSCs in Richtung der chondrogenen Linie vordifferenziert, induzieren TGF- $\beta$  und *bone morphogenic protein* (BMP)-2 die Synthese der Matrixproteine Kollagen Typ II sowie Proteoglykan.

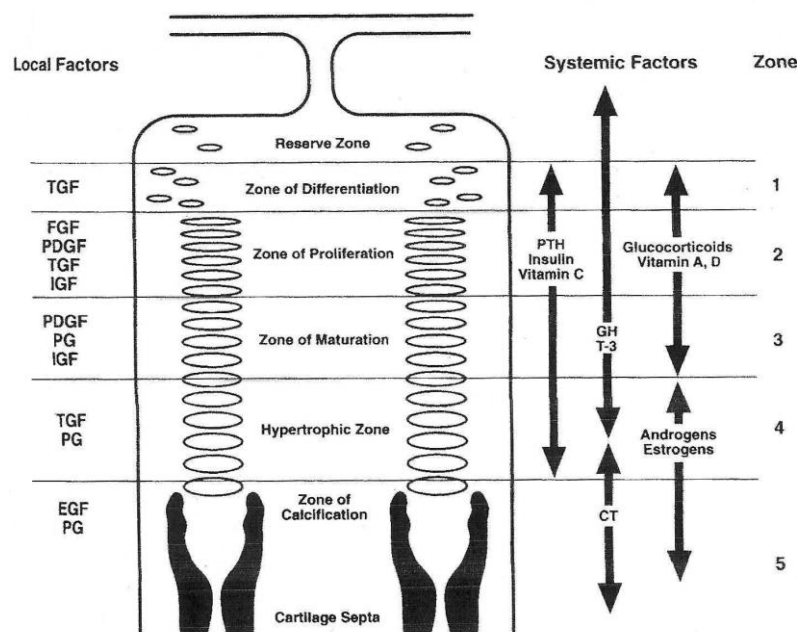


Abb. 27: Die chondrogene Wachstumsplatte mit den regulierenden Faktoren (Kaschte 2007)

Dass die *in-vitro*-Chondrogenese ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht erfolgt, konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Die ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren

ren kultivierten Zellkulturen zeigten kein chondrogenes Genexpressionsmuster und keine Synthese von knorpelspezifischen Komponenten der ECM auf. Die Zellpopulation konnte durch den Mangel an Wachstumsfaktoren entweder apoptotisch geworden sein (Wyllie 1980), oder auch in die reversible G0-Phase, in das Ruhestadium oder in die so genannte *quieszenz*, versetzt worden sein (Pardee 1989).

Die Differenzierung von hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie der in der Passage 6 durch bFGF vorstimulierten und dann unter Zugabe von TGF- $\beta_3$  in Passage sieben über 3 Wochen in der hochdichten Kultur differenzierten Zellen erzielte bessere Ergebnisse in der Pellet-Kultur, als in der Membran-Kultur.

Der starke mitogene Effekt von FGF (Gospadorowicz et al. 1982) zur Stimulation der Proliferation von MSCs in Monolayer Kultur bei der Zellvermehrung wurde bestätigt. Eine höhere Proliferationsrate durch FGF führte auch zur höheren Proteoglykansynthese (Slobodianski 2006). Auch in dieser Arbeit exprimierten die ohne FGF vermehrten Zellen in der Pellet-Kultur geringere Mengen an Aggrekan.

In Membran-Kulturen war die Aggrekan-Expression durch die FGF Vorstimulation ebenfalls beeinflusst. Die vorstimulierten Membran-Kulturen exprimierten mehr Aggrekan als die nicht vorstimulierten.

TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$  gehören zur großen Familie von Wachstumsfaktoren „transforming growth factors“ (TGFs) (Massague et al. 1990). Zum ersten Mal wurde TGF- $\beta$  als ein das Wachstum von Fibroblasten stimulierender Stoff beschrieben (Roberts et al. 1981). Die Wirkung von TGF- $\beta$  hängt vom Zelltyp ab (Stalinska et al. 2005). TGF- $\beta$  regelt unterschiedliche Abläufe in Zellen, z. B., neurotrophe Funktionen (Brionne et al. 2003) und Wachstum (Kriegelstein et al. 1998), antiproliferative Wirkung (Close et al. 2005), differenzierende Wirkung (Falk et al. 2008) und Synthesefunktionen (van Osch et al. 2001).

TGFs regulieren die Entwicklung des knorpeligen Skeletts während der Embryogenese (Kawaguchi et al. 2005). Außerdem konnte eine stabilisierende Wirkung von TGFs für Knorpel gezeigt werden (Böhme et al. 1995), da der Anteil an Proteoglykanen ohne TGFs abnahm (Lee et al. 2004). FGF und die Konzentration von TGF- $\beta$  regulieren unter anderem die Expression und die Sezernierung von TGF- $\beta$  (Ruscetti et al. 2005).

TGF- $\beta_3$  stellt einen potentiellen chondrogenen Faktor während der Differenzierung der MSCs dar und eine hohe Expression findet in der proliferativen Zone der knorpeligen Wachstumsplatte statt (Matsunaga et al. 1999). Angesichts der Beteiligung an der *in-vivo*-Chondrogenese wird TGF- $\beta_3$  in 2D- und 3D-Kultur bei der *in-vitro*-Chondrogenese



von MSCs für Tissue Engineering eingesetzt (Pittenger et al. 1999; Alhadlaq et al. 2004, 2005). Bei der gesteuerten Stimulation der kontinuierlichen chondrogenen Differenzierung von MSCs durch TGF- $\beta_3$  mittels PLGA-Mikrosphären wird eine Konzentration von 10 ng/ml TGF- $\beta_3$  zur chondrogenen Differenzierung von MSCs verwendet (Moioli et al. 2007).

Bei Untersuchungen der Effekte von Mitgliedern der TGF- $\beta$  und BMP Familie (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$  und BMP-2) auf die chondrogene Differenzierung *in vitro* ergab sich, dass TGF- $\beta_3$  und BMP-2 eine Zunahme von extrazellulären Molekülen in Mikro-masskulturen bewirken (Roark et al. 1994).

TGF- $\beta_3$  ist ein häufig verwendeter Wachstumsfaktor für die chondrogene Differenzierung von MSCs. Mit TGF- $\beta_3$  und Dexamethason in Richtung der chondrogenen Linie differenzierte MSCs exprimierten knopelspezifische Moleküle, wie Kollagen Typ II und Aggrekan, in der Pellet-Kultur (Niemeyer et al. 2004; Chen et al. 2005; Derfoul et al. 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta_3$  die Expression von Kollagen Typ II stärker induzierte, als die Expression vom Kollagen Typ I (Slobodianski 2006; Im et al. 2006). Außerdem konnte eine Wirkung von TGF- $\beta_3$  auf die Expression von Proteoglykanen gezeigt werden (Indrawattana et al. 2004).

Die früheren Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Die Zugabe von TGF- $\beta_3$  während der Differenzierung von mit bFGF vorstimulierten hMSCs in der Passage 7 führte zur Expression vom Kollagen Typ II und Aggrekan in der Pellet-Kultur. Nicht vorstimulierte Kulturen, die während der Differenzierung mit bFGF zusammen mit TGF- $\beta_3$  differenziert wurden, exprimierten nur das Matrixprotein Aggrekan und kein Kollagen Typ II. Auch die gleichzeitige Zugabe von FGF und TGF- $\beta_3$  während der Differenzierung erwies sich nicht als sinnvoll. Während bFGF die Zellen zur Mitose stimuliert, regt TGF- $\beta_3$  die Zellen zur chondrogenen Differenzierung an. Es ist bekannt, dass TGF- $\beta_3$  einer der wichtigsten Faktoren der chondrogenen Differenzierung von MSCs und der Bildung der ECM darstellt (Indrawattana et al. 2004; Chen et al. 2005; Zhang et al. 2006). Zudem arretiert TGF- $\beta_3$  den Zellzyklus sowohl direkt durch die Induktion der Expression von *Cyclin dependent kinase inhibitors* (CDKIs) (Massague et al. 2000), als auch indirekt durch die Antagonisierung des mitogenen Effektes von FGF (Hunter et al. 1993; Vergeli et al. 1995).

FGFs förderten aber auch den Beginn der hypertrophen Differenzierung, indem sie das *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) / *Indian hedgehog* (Ihh) System inhibierten (Dailey et al. 2003; Vortkamp 2003). PTHrP und Ihh sind Signalmoleküle der

Rückkoppelungsschleife, mit deren Hilfe die negative Regulation der Chondrogenese stattfindet, somit werden Chondrozyten nicht hypertroph.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von FGF während der Proliferation für die chondrogene Vordifferenzierung von hMSCs mit der nachfolgenden Zugabe von TGF- $\beta_3$  während der Differenzierung von hMSCs in Richtung der chondrogenen Linie in hochdichten 3D-Kulturen zu den besten Ergebnissen bezüglich chondrogenem Potential der Kulturen führte.

## 2.7 Hypertrophie der hMSCs

Artikuläre Chondrozyten erreichen den hypertrophen Zustand bei der Chondrogenese *in vivo* aufgrund der negativen Regulation nicht (Lanske et al. 1996; Girkontaite et al. 1996).

Die negative Regulation der Einleitung der hypertrophen Differenzierung wird von zwei sezernierten Signalfaktoren *Indian hedgehog* (Ihh) sowie *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) durchgeführt. Der erste von prähypertrophen Chondrozyten sezernierte Signalfaktor Ihh induziert die Expression von PTHrP in proliferierenden Chondrozyten. Die PTHrP-Expression führt dazu, dass die proliferierenden Chondrozyten ihren Differenzierungszustand beibehalten (Vortkamp 2003; Weiss et al. 2010).

In dieser Unternehmung durchliefen hMSCs Differenzierungsstufen bis zum hypertrophen Zustand. Es wurde Hypertrophiemarker COL10A1 auf mRNA-Ebene in beiden Kulturformen detektiert, wobei die Membran-Kultur mehr Kollagen Typ X synthetisierte, als die Pellet-Kultur.

Dieser Fakt macht darauf aufmerksam, dass die negative Regulation bei der Durchführung der *in-vitro*-Differenzierung von hMSCs fehlt. Die Erkenntnisse über die negative Steuerung (Vortkamp et al. 1996) während der *in-vivo*-Entwicklung von MSCs zu artikulären Chondrozyten in die Durchführung der Differenzierung von MSCs zu artikulären Chondrozyten *in vitro* umzusetzen, ist bisher nicht gelungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beim Vergleich der beiden Kulturen die Differenzierung von adulten hMSCs in der Passage 7 in Pellet-Kulturen erfolgreicher durchgeführt werden konnte, als in Membran-Kulturen.

Die dafür in Frage kommenden Erklärungen, wie Sauerstoffkondition, Wechselwirkung zwischen Substrat-Zelle, hydrostatischer Druck sowie die Anzahl der Zellpassagen, wurden diskutiert.

Neben den verwendeten Kulturtechniken, um chondrogene *in-vitro*-Differenzierungen durchzuführen, existiert eine Reihe anderer Kulturtechniken. Sie umfassen andere Kulturkonditionen und Differenzierungsfaktoren. In *submersed* Kulturen (Kim et al. 2009), wie z. B. Transwel Kulturen (Murdoch et al. 2007), werden Zellen vom Medium bedeckt auf einer Membran kultiviert. Der chondrogenen Differenzierung kommt hier sowohl das Substrat, als auch der hydrostatische Druck zugute. Eine Konditionierung des Mediums in dem kultivierten Gewebe mit autokrinen Wachstumsfaktoren wird ermöglicht. Durch diese Faktoren verbessert sich die Gewebequalität. In dynamischen Kulturen bewirkt der *dynamische* Druck noch stärkere chondroinduktive Wirkungen auf mesenchymale Stammzellen (Hodge et al. 1986). Der zyklische Druck ist dabei, bezogen auf die Proteoglykansynthese, dem statischen überlegen (Uchio et al. 2000) und induziert eine Chondrogenese in humanen adipösen Progenitorzellen im Vergleich zur Wirkung von atmosphärem Druck (Ogawa et al. 2009). Auch die Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten und die Ausbildung der extrazellulären Matrix funktioniert in dynamischen Zellkulturen im Vergleich zu statischen Zellkulturen mit besseren Ergebnissen (Furukawa et al. 2007) und führt zu einer Verringerung der Kollagen Typ I-Expression (Akmal et al. 2006).

Die gegenwärtigen Fortschritte in der Entwicklung von Kulturtechniken für die chondrogene Differenzierung von Stammzellen sind eine gute Grundlage für die zukünftige Möglichkeit, Knorpelgewebe *in vitro* herzustellen.

## V Zusammenfassung

Aufgrund der Zunahme an Gelenkerkrankungen wie Arthrose besteht ein steigender Bedarf an rekonstruktiven Maßnahmen mit dem Versuch der Herstellung knorpelartigen Gewebes. Der hyaline Gelenkknorpel ist durch die spezifischen Knorpelzellen, aber auch durch den Aufbau der ECM charakterisiert, die die Stützfunktion gewährleistet. Proteoglykane und Kollagen Typ II garantieren die Druck- und Zugfestigkeit der Matrix und werden von Chondrozyten synthetisiert.

Die Herausforderung besteht nicht nur in der Differenzierung von Chondrozyten, sondern auch in der Erschaffung einer funktionellen Matrix. Daneben wird versucht, eine optimale Steuerung der *in-vitro*-Differenzierung unter Umgehung der Hypertrophie und Aufrechterhaltung des chondrogenen Phänotyps zu erzielen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Kulturform zu untersuchen, die auf hochdichten Zellkulturen basiert, in denen differenzierte Zellen eine autologe Matrix hervorbringen. Die Membran-Kulturen wurden mit herkömmlichen Pellet-Kulturen verglichen und unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf ihr chondrogenes Potential untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in-vitro*-Differenzierung von hMSCs in Passage 7 in Richtung der chondrogenen Linie in hochdichten 3D-Zellkulturen an der Luft-Medium-Interphase (Membran-Kultur) und im Medium (Pellet-Kultur) verglichen. Hierbei wurden unterschiedliche Wachstumsfaktoren verwendet. Die Kulturen wurden teilweise mit FGF vorstimuliert und dann mit den Wachstumsfaktoren FGF und TGF- $\beta_3$  oder der Kombination über drei Wochen differenziert. Undifferenzierte Kulturen wurden als Kontrollen verwendet.

Danach wurden die Kulturen auf ihr Genexpressionsmuster mittels Real-Time PCR (Kollagen Typ II und Aggrekan, Kollagen Typ X und Kollagen Typ I) untersucht. Die Kulturen wurden histologisch und immunhistologisch auf knorpelspezifische Marker (Aggrekan, Kollagen Typ II) analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der hMSCs in Passage 7 in Pellet-Kulturen ein höheres chondrogenes Differenzierungspotential aufwies, als die nur teilweise erfolgte Differenzierung in Membran-Kulturen. Dies ließ sich aus der nachgewiesenen Expression von Kollagen Typ II in Pellet-Kulturen sowohl quantitativ auf

mRNA-Ebene (Real-Time PCR) als auch histologisch erschließen. Währenddessen exprimierten Membran-Kulturen kein Kollagen Typ II. Außerdem zeigten sie eine geringere Expression von Aggrekan.

Das führt zur Aufstellung der Hypothese, dass die Bedingungen im Medium (Pellet-Kultur) die Differenzierung von hMSCs in Passage 7 in Richtung der chondrogenen Linie besser unterstützen, als die Bedingungen der Membran-Kultur. Mögliche Ursachen für die Unterschiede bei der chondrogenen Differenzierung könnten aus dem Einfluss des Sauerstoffs an der Oberfläche der Kulturen resultieren.

Obwohl inmitten des Pellets auch sauerstoffarme Bedingungen herrschen, führt die Membran-Kultur nicht zum Abschluss der chondrogenen Differenzierung von MSCs.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Faktoren, wie der hydrostatische Druck und die Diffusionskapazität der Wachstumsfaktoren, die Chondrogenese beeinflussen können.

Zusammenfassend kommt die Technik Membran-Kultur für die weiteren Versuche bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs in Frage, falls sie bezüglich der chondrogenen Bedingungen modifiziert wird. Zum Beispiel, Herstellung von sauerstoffarmen Situation an der Oberfläche der Zellkultur und vom dynamischen hydrostatischen Druck könnte das chondrogene Potential der Technik Membran-Kultur erhöhen.

**VI Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Prinzips der Druckfestigkeit, der biomechanischen Eigenschaft des hyalinen Knorpels (Hardingham 1998)	Seite 2
Abb. 2:	Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der ECM (vgl. Junqueira et al. 1996,184)	Seite 3
Abb. 3:	Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der ECM (Grässel 2006)	Seite 3
Abb. 4:	Gelenkknorpel (Junqueira et al. 1996)	Seite 4
Abb. 5:	Morphologie des Gelenkknorpels (von Martinek 2003 modifiziert durch Mandy Seifert 2006)	Seite 5
Abb. 6:	Endochondrale Ossifikation (Vortkamp 2003)	Seite 9
Abb. 7:	Wachstumszonen des endochondralen Knochens (Vortkamp 2003)	Seite 10
Abb. 8:	Die Stadien der Chondrogenese in vivo (nach Lefebvre & Smits 2005)	Seite 11
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Differenzierung von MSCs (nach Bakch et al. 2004; modifiziert durch A. Slobodianski 2006)	Seite 12
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Signalübertragung des TFG- $\beta$ . (mod. nach Derynck und Feng 1997 durch Kaschte 2007)	Seite 13
Abb. 11:	Kontrolle der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten (Vortkamp 2003)	Seite 14
Abb. 12:	Die Auftrennung der Zellsuspension im Ficoll-Gradienten (nach Slobodianski 2006)	Seite 17
Abb. 13:	Aufbau der Glass-Technik (David L. Cockroft 1997)	Seite 21
Abb. 14:	Der Aufbau der Organoid-Kultur (Trowell 1954)	Seite 21
Abb. 15:	Technik der Pellet-Kultur. (Computergrafische Darstellung von Lars Schliack)	Seite 25
Abb. 16:	Drahtgewebe in Leinen-(glatt) Bindung	Seite 26
Abb. 17:	Die Membran-Technik (Computergrafische Darstellung von Lars Schliack)	Seite 26
Abb. 18:	Relative Quantifizierung von COL2A1 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR	Seite 32
Abb. 19:	Immunhistochemischer Nachweis von COL2A1 in der Pellet-Kultur	Seite 32
Abb. 20:	Relative Quantifizierung von ACAN auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR	Seite 33
Abb. 21:	Histologischer Nachweis von Proteoglykanen in der Membran- (A) und in der Pellet-Kultur (B), die mit FGF vorstimuliert und in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$ differenziert wurden. Alcian Blau Färbung.	Seite 34

Abb. 22:	Histologischer Nachweis von Proteoglykanen in der Membran- (A) und in der Pellet-Kultur (B) die nicht mit FGF vorstimuliert und in Passage 7 mit TGF- $\beta_3$ und FGF differenziert wurden. Alcian Blau Färbung.	Seite 34
Abb. 23:	Relative Quantifizierung von COL1A2 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR	Seite 35
Abb. 24:	Relative Quantifizierung von COL10A1 auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR	Seite 36
Abb. 25:	Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen (Caplan 1994)	Seite 37
Abb. 26:	Faktoren der Zelldifferenzierung (Franke 1995)	Seite 38
Abb. 27:	Die chondrogene Wachstumsplatte mit den regulierenden Faktoren (Kaschte 2007)	Seite 50

**VII Abkürzungsverzeichnis**

ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
cDNA	engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CD	eine große Familie von Genen namens Cluster der Differenzierung
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
3D	dreidimensional
CS	Chondroitinsulfat
ECM	extrazelluläre Matrix
FKS	fötales Kälberserum
g	Rotations per Minute
GAG	Glykoseaminoglykane
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HA	Hyaluronsäure
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
IU	<i>international unit</i>
KS	Keratinsulfat
LP	<i>link protein</i>
L-Asc-2-Phosphat	L-Ascorbinsäure 2-Phosphat
µg/L	Mikrogramm pro Liter
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min	Minute
µM	Mikrometer
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA



O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Proteoglykane
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related peptide</i>
qRT-PCR	<i>Real-Time PCR (engl. polymerase chain reaction)</i>
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunde
SYBR Green	Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von DNA
TGF	<i>transforming growth factor</i>

**VIII Literaturverzeichnis**

Adkisson, HD, M P Gillis, E C Davis, W Maloney, K A Hruska, 2001, In vitro generation of scaffold independent neocartilage: Clin.Orthop.Relat Res., p. S280-S294.

Ahmed, N, R Dreier, A Gopferich, J Grifka, S Grassel, 2007, Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells: Cell Physiol Biochem., v. 20, p. 665-678.

Akmal, M, A Anand, B Anand, M Wiseman, A E Goodship, G Bentley, 2006, The culture of articular chondrocytes in hydrogel constructs within a bioreactor enhances cell proliferation and matrix synthesis: J.Bone Joint Surg.Br., v. 88, p. 544-553.

Alhadlaq, A, J H Elisseeff, L Hong, C G Williams, A I Caplan, B Sharma, R A Kopher, S Tomkoria, D P Lennon, A Lopez, J J Mao, 2004, Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle: Ann.Biomed.Eng, v. 32, p. 911-923.

Alhadlaq, A, J J Mao, 2005, Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle: J.Bone Joint Surg.Am., v. 87, p. 936-944.

Allsopp, RC, H Vaziri, C Patterson, S Goldstein, E V Younglai, A B Futcher, C W Greider, C B Harley, 1992, Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 89, p. 10114-10118.

Altman, GH, R L Horan, I Martin, J Farhadi, P R Stark, V Volloch, J C Richmond, G Vunjak-Novakovic, D L Kaplan, 2002, Cell differentiation by mechanical stress: FASEB J., v. 16, p. 270-272.

Ando W, Tateishi K, Hart DA, Tanaka K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Biomaterials. 2007 Dec;28(36):5462-70.

Aszodi, A, E B Hunziker, C Brakebusch, R Fassler, 2003, Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis: Genes Dev., v. 17, p. 2465-2479.

Augst, A, D Marolt, L E Freed, C Vepari, L Meinel, M Farley, R Fajardo, N Patel, M Gray, D L Kaplan, G Vunjak-Novakovic, 2008, Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors: J.R.Soc.Interface, v. 5, p. 929-939.

Aung, T, H Miyoshi, T Tun, N Ohshima, 2002, Chondroinduction of mouse mesenchymal stem cells in three-dimensional highly porous matrix scaffolds: J.Biomed.Mater.Res., v. 61, p. 75-82.

Baird, A, 1994, Potential mechanisms regulating the extracellular activities of basic fibroblast growth factor (FGF-2): Mol.Reprod.Dev., v. 39, p. 43-48.

Baird, A, P Bohlen, N Ling, R Guillemin, 1985, Radioimmunoassay for fibroblast growth factor (FGF): release by the bovine anterior pituitary in vitro: Regul.Pept., v. 10, p. 309-317.

- Baksh, D, L Song, R S Tuan, 2004, Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy: *J.Cell Mol.Med.*, v. 8, p. 301-316.
- Balemans, W, W Van Hul, 2002, Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators: *Dev.Biol.*, v. 250, p. 231-250.
- Barry, FP, J M Murphy, 2004, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization: *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 36, p. 568-584.
- Bensaid, W, J T Triffitt, C Blanchat, K Oudina, L Sedel, H Petite, 2003, A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation: *Biomaterials*, v. 24, p. 2497-2502.
- Benvenuti, S, R Cramer, C C Quinn, J Bruce, M Zvelebil, S Corless, J Bond, A Yang, S Hockfield, A L Burlingame, M D Waterfield, P S Jat, 2002, Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts: *Mol.Cell Proteomics.*, v. 1, p. 280-292.
- Bianchi, G, A Banfi, M Mastrogiacomo, R Notaro, L Luzzatto, R Cancedda, R Quarto, 2003, Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2: *Exp.Cell Res.*, v. 287, p. 98-105.
- Bobick, BE, F H Chen, A M Le, R S Tuan, 2009, Regulation of the chondrogenic phenotype in culture: *Birth Defects Res.C.Embryo.Today*, v. 87, p. 351-371.
- Bodnar, AG, M Ouellette, M Frolkis, S E Holt, C P Chiu, G B Morin, C B Harley, J W Shay, S Lichtsteiner, W E Wright, 1998, Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells: *Science*, v. 279, p. 349-352.
- Bohme, K, K H Winterhalter, P Bruckner, 1995, Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy: *Exp.Cell Res.*, v. 216, p. 191-198.
- Bonaventure, J, N Kadhom, L Cohen-Solal, K H Ng, J Bourguignon, C Lasselin, P Freisinger, 1994, Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads: *Exp.Cell Res.*, v. 212, p. 97-104.
- Brighton, CT, R B Heppenstall, D A Labosky, 1971, An oxygen microelectrode suitable for cartilage and cancellous bone: *Clin.Orthop.Relat Res.*, v. 80, p. 161-166.
- Brionne, TC, I Tesseur, E Masliah, T Wyss-Coray, 2003, Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain: *Neuron*, v. 40, p. 1133-1145.
- Brittberg, M, A Lindahl, A Nilsson, C Ohlsson, O Isaksson, L Peterson, 1994, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation: *N.Engl.J.Med.*, v. 331, p. 889-895.
- Bruder, SP, N Jaiswal, S E Haynesworth, 1997, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation: *J.Cell Biochem.*, v. 64, p. 278-294.

- Bruder, SP, N S Ricalton, R E Boynton, T J Connolly, N Jaiswal, J Zaia, F P Barry, 1998, Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation: *J.Bone Miner.Res.*, v. 13, p. 655-663.
- Buckwalter, JA, 2002, Articular cartilage injuries: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 21-37.
- Buckwalter, JA, T D Brown, 2004, Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 7-16.
- Buckwalter, JA, H J Mankin, 1998, Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions: *Instr.Course Lect.*, v. 47, p. 477-486.
- Butnariu-Ephrat, M, D Robinson, D G Mendes, N Halperin, Z Nevo, 1996, Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 234-243.
- Cancedda, R, P Castagnola, F D Cancedda, B Dozin, R Quarto, 2000, Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis: *Int.J.Dev.Biol.*, v. 44, p. 707-714.
- Cancedda, R, C F Descalzi, P Castagnola, 1995, Chondrocyte differentiation: *Int.Rev.Cytol.*, v. 159, p. 265-358.
- Caplan, AI, 1991, Mesenchymal stem cells: *J.Orthop.Res.*, v. 9, p. 641-650.
- Caplan, AI, 1994, The mesengenic process: *Clin.Plast.Surg.*, v. 21, p. 429-435.
- Caplan, AI, S P Bruder, 2001, Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century: *Trends Mol.Med.*, v. 7, p. 259-264.
- Carter, DR, G S Beaupre, M Wong, R L Smith, T P Andriacchi, D J Schurman, 2004, The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. S69-S77.
- Chen, Y, X Shi-wen, J van Beek, L Kennedy, M McLeod, E A Renzoni, G Bou-Gharios, S Wilcox-Adelman, P F Goetinck, M Eastwood, C M Black, D J Abraham, A Leask, 2005, Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor-beta/activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease: *Am.J.Pathol.*, v. 167, p. 1699-1711.
- Close, JL, B Gumuscu, T A Reh, 2005, Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling: *Development*, v. 132, p. 3015-3026.
- Dailey, L, E Laplantine, R Priore, C Basilico, 2003, A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation: *J.Cell Biol.*, v. 161, p. 1053-1066.
- De Ugarte, DA, Z Alfonso, P A Zuk, A Elbarbary, M Zhu, P Ashjian, P Benhaim, M H Hedrick, J K Fraser, 2003, Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow: *Immunol.Lett.*, v. 89, p. 267-270.

- Derfoul, A, G L Perkins, D J Hall, R S Tuan, 2006, Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes: *Stem Cells*, v. 24, p. 1487-1495.
- Derynck, R, P B Lindquist, A Lee, D Wen, J Tamm, J L Graycar, L Rhee, A J Mason, D A Miller, R J Coffey, ., 1988, A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3: *EMBO J.*, v. 7, p. 3737-3743.
- Domm, C, J Fay, M Schunke, B Kurz, 2000, [Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure]: *Orthopade*, v. 29, p. 91-99.
- Elder, SH, J W Shim, A Borazjani, H M Robertson, K E Smith, J N Warnock, 2008, Influence of hydrostatic and distortional stress on chondroinduction: *Biorheology*, v. 45, p. 479-486.
- Emans, PJ, L W van Rhijn, T J Welting, A Cremers, N Wijnands, F Spaapen, J W Voncken, V P Shastri, 2010, Autologous engineering of cartilage: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 107, p. 3418-3423.
- Engler, AJ, H L Sweeney, D E Discher, J E Schwarzbauer, 2007, Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation: *J.Musculoskelet.Neurol.Interact.*, v. 7, p. 335.
- Enomoto-Iwamoto, M, M Iwamoto, K Nakashima, Y Mukudai, D Boettiger, M Pacifici, K Kurisu, F Suzuki, 1997, Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes: *J.Bone Miner.Res.*, v. 12, p. 1124-1132.
- Entcheva, E, H Bien, L Yin, C Y Chung, M Farrell, Y Kostov, 2004, Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding: *Biomaterials*, v. 25, p. 5753-5762.
- Erggelet, C, M Sittinger, A Lahm, 2003, The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint: *Arthroscopy*, v. 19, p. 108-110.
- Falk, S, H Wurdak, L M Ittner, F Ille, G Sumara, M T Schmid, K Draganova, K S Lang, C Paratore, P Leveen, U Suter, S Karlsson, W Born, R Ricci, M Gotz, L Sommer, 2008, Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion: *Cell Stem Cell*, v. 2, p. 472-483.
- Fell, HB, 1969, The effect of environment on skeletal tissue in culture: *Embryologia.(Nagoya)*, v. 10, p. 181-205.
- Fell, HB, R Robison, 1929, The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro: *Biochem.J.*, v. 23, p. 767-784.
- Fernandes, H, A Mentink, R Bank, R Stoop, C van Blitterswijk, J de Boer, 2010, Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells: *Tissue Eng Part A*, v. 16, p. 1693-1702.

- Fortier, LA, A J Nixon, J Williams, C S Cable, 1998, Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: *Am.J.Vet.Res.*, v. 59, p. 1182-1187.
- Francis-West, P, R Ladher, A Barlow, A Graveson, 1998, Signalling interactions during facial development: *Mech.Dev.*, v. 75, p. 3-28.
- Friedenstein, AJ, J F Gorskaja, N N Kulagina, 1976, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs: *Exp.Hematol.*, v. 4, p. 267-274.
- Friedenstein, AJ, K V Petrakova, A I Kurolesova, G P Frolova, 1968, Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues: *Transplantation*, v. 6, p. 230-247.
- Furukawa, KS, K Imura, T Tateishi, T Ushida, 2008, Scaffold-free cartilage by rotational culture for tissue engineering: *J.Biotechnol.*, v. 133, p. 134-145.
- Girkontaite, I, S Frischholz, P Lammi, K Wagner, B Swoboda, T Aigner, M K von der, 1996, Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies: *Matrix Biol.*, v. 15, p. 231-238.
- Goldfarb, M, 2005, Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function: *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 16, p. 215-220.
- Gospodarowicz, D, G M Lui, J Cheng, 1982, Purification in high yield of brain fibroblast growth factor by preparative isoelectric focusing at pH 9.6: *J.Biol.Chem.*, v. 257, p. 12266-12276.
- Grimshaw, MJ, R M Mason, 2000, Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 8, p. 386-392.
- Han, D, P I Gouma, 2006, Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix: *Nanomedicine.*, v. 2, p. 37-41.
- Hanamura, H, M R Urist, 1978, Osteogenesis and chondrogenesis in transplants of Dunn and Ridgway osteosarcoma cell cultures: *Am.J.Pathol.*, v. 91, p. 277-298.
- Hangody, L, G Kish, Z Karpati, I Udvarhelyi, I Szigeti, M Bely, 1998, Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice: *Orthopedics*, v. 21, p. 751-756.
- Hardingham, T, 1998, Cartilage; Aggrecan-Link Protein-Hyaluronan Aggregates. Hrsg.: Hascall VC, Yanagishita M: *Hyaluronan today*, Seikagaku Corporation, Jun, S. Glycoforum: <http://glycoforum.gr.jp>.
- Häusler, G, M Helmreich, S Marlovits, M Egerbacher, 2002, Integrins and extracellular matrix proteins in the human childhood and adolescent growth plate: *Calcif Tissue Int. Sep*; 71(3): 212-8. Epub 2002 Aug 6.
- Hayflick, L, 1985, The cell biology of aging: *Clin.Geriatr.Med.*, v. 1, p. 15-27.
- Hayflick, L, P S Moorhead, 1961, The serial cultivation of human diploid cell strains: *Exp.Cell Res.*, v. 25, p. 585-621.

- Haynesworth, SE, J Goshima, V M Goldberg, A I Caplan, 1992, Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow: *Bone*, v. 13, p. 81-88.
- Healy, C, D Uwanogho, P T Sharpe, 1999, Regulation and role of Sox9 in cartilage formation: *Dev.Dyn.*, v. 215, p. 69-78.
- Hirsch, MS, L E Lunsford, V Trinkaus-Randall, K K Svoboda, 1997, Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated: *Dev.Dyn.*, v. 210, p. 249-263.
- Hodge, WA, R S Fijan, K L Carlson, R G Burgess, W H Harris, R W Mann, 1986, Contact pressures in the human hip joint measured in vivo: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 83, p. 2879-2883.
- Hunter, KE, M B Sporn, A M Davies, 1993, Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes: *Glia*, v. 7, p. 203-211.
- Hutmacher, DW, A Kirsch, K L Ackermann, M B Hurzeler, 2001, A tissue engineered cell-occlusive device for hard tissue regeneration--a preliminary report: *Int.J.Periodontics.Restorative.Dent.*, v. 21, p. 49-59.
- Hwang, NS, S Varghese, C Puleo, Z Zhang, J Elisseeff, 2007, Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: *J.Cell Physiol*, v. 212, p. 281-284.
- Hynes, RO, 2002, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines: *Cell*, v. 110, p. 673-687.
- Ichinose, S, K Yamagata, I Sekiya, T Muneta, M Tagami, 2005, Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, v. 32, p. 561-570.
- Indrawattana, N, G Chen, M Tadokoro, L H Shann, H Ohgushi, T Tateishi, J Tanaka, A Bunyaratvej, 2004, Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 320, p. 914-919.
- Irie, Y, H Mizumoto, S Fujino, T Kajiwara, 2008, Reconstruction of cartilage tissue using scaffold-free organoid culture technique: *J.Biosci.Bioeng.*, v. 105, p. 450-453.
- Ishida, O, Y Tanaka, I Morimoto, M Takigawa, S Eto, 1997, Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway: *J.Bone Miner.Res.*, v. 12, p. 1657-1663.
- Itoh, S, J E Aubin, 2009, A novel purification method for multipotential skeletal stem cells: *J.Cell Biochem.*, v. 108, p. 368-377.
- Jäger, M, A Wild, M Fuss, A Werner, R Krauspe, 2002, Advantages of biomatrices in chondrogenesis of pluripotent mesenchymal stem: *Z Orthop Ihre Grenzgeb. Nov-Dec; 140(6)*: 681-9.

- Janssen, M, M P van der, J W de Jong, 1993, Antioxidant defences in rat, pig, guinea pig, and human hearts: comparison with xanthine oxidoreductase activity: *Cardiovasc.Res.*, v. 27, p. 2052-2057.
- Ji, YH, J L Ji, F Y Sun, Y Y Zeng, X H He, J X Zhao, Y Yu, S H Yu, W Wu, 2010, Quantitative proteomics analysis of chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/MS: *Mol.Cell Proteomics.*, v. 9, p. 550-564.
- Johnstone, B, T M Hering, A I Caplan, V M Goldberg, J U Yoo, 1998, In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells: *Exp.Cell Res.*, v. 238, p. 265-272.
- Jones, EA, S E Kinsey, A English, R A Jones, L Straszynski, D M Meredith, A F Markham, A Jack, P Emery, D McGonagle, 2002, Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells: *Arthritis Rheum.*, v. 46, p. 3349-3360.
- Jung, Y, S H Kim, S H Kim, Y H Kim, J Xie, T Matsuda, B G Min, 2008, Cartilaginous tissue formation using a mechano-active scaffold and dynamic compressive stimulation: *J.Biomater.Sci.Polym.Ed.*, v. 19, p. 61-74.
- Junqueira, LC, J Carneiro, 1996, *Histologie*. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von T.H. Schiebler. 4 Auflage, (ISBN:9783540219651).
- Kaps, C, S Fuchs, M Endres, S Vetterlein, V Krenn, C Perka, M Sittlinger, 2004, [Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece]: *Orthopade*, v. 33, p. 76-85.
- Kawaguchi, J, P J Mee, A G Smith, 2005, Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors: *Bone*, v. 36, p. 758-769.
- Kil, IS, T L Huh, Y S Lee, Y M Lee, J W Park, 2006, Regulation of replicative senescence by NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 40, p. 110-119.
- Kim, EJ, Z M Che, Y J Park, Y S Hwang, K Y Kim, d W Jung, N K Jeon, Y W Choi, E J Lee, J Kim, 2009, Morphogenesis and biological significance of spindle cell transformation in a spindle cell carcinoma: *Cancer Lett.*, v. 275, p. 61-71.
- Kosinska, J, P Slowikowski, 2004, Technical aspects of portal technology application for e-health systems: *Stud.Health Technol.Inform.*, v. 105, p. 12-20.
- Kriegelstein, K, L Farkas, K Unsicker, 1998, TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins: *J.Neurobiol.*, v. 37, p. 563-572.
- Lane, JM, C T Brighton, B J Menkowitz, 1977, Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage: *J.Rheumatol.*, v. 4, p. 334-342.
- Lanske, B, A C Karaplis, K Lee, A Luz, A Vortkamp, A Pirro, M Karperien, L H Defize, C Ho, R C Mulligan, A B Abou-Samra, H Juppner, G V Segre, H M



- Kronenberg, 1996, PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth: *Science*, v. 273, p. 663-666.
- Lee, JW, Y H Kim, S H Kim, S H Han, S B Hahn, 2004, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications: *Yonsei Med.J.*, v. 45 Suppl, p. 41-47.
- Lee, RB, J P Urban, 2002, Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage: *Arthritis Rheum.*, v. 46, p. 3190-3200.
- Lefebvre, V, P Smits, 2005, Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation: *Birth Defects Res.C.Embryo.Today*, v. 75, p. 200-212.
- Lewis, EA, J T Irving, 1970, An autoradiographic investigation of bone remodelling in the rat calvarium grown in organ culture: *Arch.Oral Biol.*, v. 15, p. 769-776.
- Li, M, N Amizuka, K Oda, K Tokunaga, T Ito, K Takeuchi, R Takagi, T Maeda, 2004, Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis: *Microsc.Res.Tech.*, v. 64, p. 330-342.
- Lorda-Diez, CI, J A Montero, C Martinez-Cue, J A Garcia-Porrero, J M Hurle, 2009, Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme: *J.Biol.Chem.*, v. 284, p. 29988-29996.
- Mackay, AM, S C Beck, J M Murphy, F P Barry, C O Chichester, M F Pittenger, 1998, Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow: *Tissue Eng*, v. 4, p. 415-428.
- Maeda, S, Fujitomo T, Okabe T, Wakitani S, Takagi M, Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells, *J Biosci Bioeng*. 2010 Dec 23. [Epub ahead of print]
- Malda, J, D E Martens, J Tramper, C A van Blitterswijk, J Riesle, 2003, Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen: *Crit Rev.Biotechnol.*, v. 23, p. 175-194.
- Maleski, MP, C B Knudson, 1996, Matrix accumulation and retention in embryonic cartilage and in vitro chondrogenesis: *Connect.Tissue Res.*, v. 34, p. 75-86.
- Markway, BD, G K Tan, G Brooke, J E Hudson, J J Cooper-White, M R Doran, 2010, Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures: *Cell Transplant.*, v. 19, p. 29-42.
- Massague, J, S W Blain, R S Lo, 2000, TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders: *Cell*, v. 103, p. 295-309.
- Massague, J, S Cheifetz, F T Boyd, J L Andres, 1990, TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 593, p. 59-72.

- Masuda, K, R L Sah, M J Hejna, E J Thonar, 2003, A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method: *J.Orthop.Res.*, v. 21, p. 139-148.
- Matsuda, C, M Takagi, T Hattori, S Wakitani, T Yoshida, 2005, Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue: *Cytotechnology*, v. 47, p. 11-17.
- Matsunaga, S, T Yamamoto, K Fukumura, 1999, Temporal and spatial expressions of transforming growth factor-betas and their receptors in epiphyseal growth plate: *Int.J.Oncol.*, v. 14, p. 1063-1067.
- Mayer-Wagner, S, Schiergens TS, Sievers B, Redeker JI, Schmitt B, Buettner A, Jansson V., Müller PE, 2010, Scaffold-free 3D cellulose acetate membrane-based cultures form large cartilaginous constructs. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):513-21.
- Mehlhorn, AT, H Schmal, S Kaiser, G Lepski, G Finkenzeller, G B Stark, N P Sudkamp, 2006, Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture: *Tissue Eng*, v. 12, p. 1393-1403.
- Minina, E, C Kreschel, M C Naski, D M Ornitz, A Vortkamp, 2002, Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation: *Dev.Cell*, v. 3, p. 439-449.
- Minina, E, H M Wenzel, C Kreschel, S Karp, W Gaffield, A P McMahon, A Vortkamp, 2001, BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation: *Development*, v. 128, p. 4523-4534.
- Moioli, EK, L Hong, J J Mao, 2007, Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: *Wound.Repair Regen.*, v. 15, p. 413-421.
- MOSCONA, A, 1961, Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro: *Exp.Cell Res.*, v. 22, p. 455-475.
- Murdoch, AD, L M Grady, M P Ablett, T Katopodi, R S Meadows, T E Hardingham, 2007, Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage: *Stem Cells*, v. 25, p. 2786-2796.
- Niemeyer, P, A Mehlhorn, M Jaeger, P Kasten, H G Simank, U Krause, N P Sudkamp, 2004, [Adult mesenchymal stem cells for the regeneration of musculoskeletal tissue]: *MMW.Fortschr.Med.*, v. 146, p. 45.
- Niswander, L, C Tickle, A Vogel, I Booth, G R Martin, 1993, FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb: *Cell*, v. 75, p. 579-587.
- Nogami, H, A Oohira, Y Terashima, M R Urist, 1978, Ultrastructure of chondrogenetic interactions between bone matrix gelatin and mesenchymal cells: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 238-245.
- Noth, U, A M Osyczka, R Tuli, N J Hickok, K G Danielson, R S Tuan, 2002, Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells: *J.Orthop.Res.*, v. 20, p. 1060-1069.

- O'Driscoll, SW, J S Fitzsimmons, C N Commisso, 1997, Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum: *J.Orthop.Res.*, v. 15, p. 682-687.
- Ogawa, R, S Mizuno, G F Murphy, D P Orgill, 2009, The effect of hydrostatic pressure on three-dimensional chondroinduction of human adipose-derived stem cells: *Tissue Eng Part A*, v. 15, p. 2937-2945.
- Ornitz, DM, P J Marie, 2002, FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease: *Genes Dev.*, v. 16, p. 1446-1465.
- Pardee, AB, 1989, G1 events and regulation of cell proliferation: *Science*, v. 246, p. 603-608.
- Pazolli, E, S A Stewart, 2008, Senescence: the good the bad and the dysfunctional: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 18, p. 42-47.
- Philp, D, S S Chen, W Fitzgerald, J Orenstein, L Margolis, H K Kleinman, 2005, Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation: *Stem Cells*, v. 23, p. 288-296.
- Pittenger, MF, A M Mackay, S C Beck, R K Jaiswal, R Douglas, J D Mosca, M A Moorman, D W Simonetti, S Craig, D R Marshak, 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells: *Science*, v. 284, p. 143-147.
- Provot, S, E Schipani, 2005, Molecular mechanisms of endochondral bone development: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 328, p. 658-665.
- Radice, M, P Brun, R Cortivo, R Scapinelli, C Battaliard, G Abatangelo, 2000, Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors: *J.Biomed.Mater.Res.*, v. 50, p. 101-109.
- Ratner, BD, 1996, The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity: *J.Mol.Recognit.*, v. 9, p. 617-625.
- Resinger, C, V Vecsei, S Marlovits, 2004, [Therapeutic options in the treatment of cartilage defects. Techniques and indications]: *Radiologe*, v. 44, p. 756-762.
- Ringe, J, T Haupl, M Sittinger, 2003, [Mesenchymal stem cells for tissue engineering of bone and cartilage]: *Med.Klin.(Munich)*, v. 98 Suppl 2, p. 35-40.
- Roark, EF, K Greer, 1994, Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro: *Dev.Dyn.*, v. 200, p. 103-116.
- Roberts, AB, M A Anzano, L C Lamb, J M Smith, M B Sporn, 1981, New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 78, p. 5339-5343.
- Ruscetti, FW, S Akel, S H Bartelmez, 2005, Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context: *Oncogene*, v. 24, p. 5751-5763.

- Sato, Y, M Terashima, N Kagiwada, T Tun, M Inagaki, T Kakuta, A Saito, 2005, Evaluation of proliferation and functional differentiation of LLC-PK1 cells on porous polymer membranes for the development of a bioartificial renal tubule device: *Tissue Eng*, v. 11, p. 1506-1515.
- Schulze-Tanzil, G, P de Souza, C H Villegas, T John, H J Merker, A Scheid, M Shakibaei, 2002, Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures: *Cell Tissue Res.*, v. 308, p. 371-379.
- Schumann, D, R Kujat, M Nerlich, P Angele, 2006, Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering: *Biomed.Mater.Eng*, v. 16, p. S37-S52.
- Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Kohda H, Kita K, Kanamoto T, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(31):8004-11. Epub 2010 Jul 31.
- Sittinger, M, J Bujia, W W Minuth, C Hammer, G R Burmester, 1994, Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture: *Biomaterials*, v. 15, p. 451-456.
- Sittinger, M, J Bujia, N Rotter, D Reitzel, W W Minuth, G R Burmester, 1996, Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques: *Biomaterials*, v. 17, p. 237-242.
- Sittinger, M, D W Hutmacher, M V Risbud, 2004, Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration: *Curr.Opin.Biotechnol.*, v. 15, p. 411-418.
- Smith, RL, J Lin, M C Trindade, J Shida, G Kajiyama, T Vu, A R Hoffman, M C van der Meulen, S B Goodman, D J Schurman, D R Carter, 2000, Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression: *J.Rehabil.Res.Dev.*, v. 37, p. 153-161.
- Solchaga, LA, J E Dennis, V M Goldberg, A I Caplan, 1999, Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage: *J.Orthop.Res.*, v. 17, p. 205-213.
- Solchaga, LA, J Gao, J E Dennis, A Awadallah, M Lundberg, A I Caplan, V M Goldberg, 2002, Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle: *Tissue Eng*, v. 8, p. 333-347.
- Solchaga, LA, J U Yoo, M Lundberg, J E Dennis, B A Huibregtse, V M Goldberg, A I Caplan, 2000, Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects: *J.Orthop.Res.*, v. 18, p. 773-780.
- Solursh, M, 1989, Extracellular matrix and cell surface as determinants of connective tissue differentiation: *Am.J.Med.Genet.*, v. 34, p. 30-34.
- Solursh, M, 1991, Formation of cartilage tissue in vitro: *J.Cell Biochem.*, v. 45, p. 258-260.
- Stalinska, L, T Ferenc, 2005, [The role of TGF-beta in cell cycle regulation]: *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online.)*, v. 59, p. 441-449.

- Takahashi, S, M R Urist, 1986, Differentiation of cartilage on three substrata under the influence of an aggregate of morphogenetic protein and other bone tissue noncollagenous proteins (BMP/iNCP): *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 227-238.
- Takata, T, H L Wang, M Miyauchi, 2001, Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes: *Clin.Oral Implants.Res.*, v. 12, p. 332-338.
- Thorogood, PV, J R Hinchliffe, 1975, An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb: *J.Embryol.Exp.Morphol.*, v. 33, p. 581-606.
- Toole, BP, 2001, Hyaluronan in morphogenesis: *Semin.Cell Dev.Biol.*, v. 12, p. 79-87.
- Tortelli, F, R Cancedda, 2009, Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro: *Eur.Cell Mater.*, v. 17, p. 1-14.
- TROWELL, OA, 1954, A modified technique for organ culture in vitro: *Exp.Cell Res.*, v. 6, p. 246-248.
- Tse, WT, J D Pendleton, W M Beyer, M C Egalka, E C Guinan, 2003, Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation: *Transplantation*, v. 75, p. 389-397.
- Tuan, RS, 2004, Biology of developmental and regenerative skeletogenesis: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. S105-S117.
- Uchio, Y, M Ochi, M Matsusaki, H Kurioka, K Katsube, 2000, Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel: *J.Biomed.Mater.Res.*, v. 50, p. 138-143.
- van Osch, GJ, S W van der Veen, H L Verwoerd-Verhoef, 2001, In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction: *Plast.Reconstr.Surg.*, v. 107, p. 433-440.
- Vortkamp, A, 2003, Molekulare Analyse der Skelettentwicklung [edoc.mpg.de/194854](http://edoc.mpg.de/194854)
- Yang, HN, J S Park, K Na, D G Woo, Y D Kwon, K H Park, 2009, The use of green fluorescence gene (GFP)-modified rabbit mesenchymal stem cells (rMSCs) co-cultured with chondrocytes in hydrogel constructs to reveal the chondrogenesis of MSCs: *Biomaterials*, v. 30, p. 6374-6385.
- Yang, IH, S H Kim, Y H Kim, H J Sun, S J Kim, J W Lee, 2004, Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells: *Yonsei Med.J.*, v. 45, p. 891-900.
- Ye, H, Z Xia, D J Ferguson, J T Triffitt, Z Cui, 2007, Studies on the use of hollow fibre membrane bioreactors for tissue generation by using rat bone marrow fibroblastic cells and a composite scaffold: *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, v. 18, p. 641-648.

Yoo, JU, I Mandell, P Angele, B Johnstone, 2000, Chondrogenitor cells and gene therapy: Clin.Orthop.Relat Res., p. S164-S170.

Yuan, H, T Kaneko, M Matsuo, 1996, Increased susceptibility of late passage human diploid fibroblasts to oxidative stress: Exp.Gerontol., v. 31, p. 465-474.

Zimmermann, B, H C Wachtel, H Somogyi, 1990, Endochondral mineralization in cartilage organoid culture: Cell Differ.Dev., v. 31, p. 11-22.

Zimmermann, B, H C Wachtel, H Somogyi, H J Merker, J P Bernimoulin, 1988, Bone formation by rat calvarial cells grown at high density in organoid culture: Cell Differ.Dev., v. 25, p. 145-154.

Zuscik, MJ, L Ma, T Buckley, J E Puzas, H Drissi, E M Schwarz, R J O'Keefe, 2007, Lead induces chondrogenesis and alters transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signaling in mesenchymal cell populations: Environ.Health Perspect., v. 115, p. 1276-1282.