

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik – Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Leitschienenfreie Knorpelregeneration
in dreidimensionalen Membrankulturen**

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

vorgelegt von

Tobias Simon Schiergens
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerd Regel
Priv. Doz. Dr. Stefan Zysk
Prof. Dr. Wolf E. Mutschler
Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Susanne Mayer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 2012

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Hyaliner Gelenkknorpel	8
1.1.1 Vorkommen und allgemeine Eigenschaften	8
1.1.2 Chondrogenese	8
1.1.3 Zusammensetzung und Organisation	11
1.1.4 Architektur und Funktion	13
1.1.5 Ernährung und Stoffaustausch.....	16
1.1.6 Gelenkknorpeldefekte	16
1.2 Humane mesenchymale Stammzellen	17
1.2.1 Eigenschaften	17
1.2.2 Differenzierung <i>in vitro</i>	19
1.3 Tissue Engineering humanen Gelenkknorpels	19
1.3.1 Grundlagen	19
1.3.2 Zellbasierte Therapiestrategien zur Gelenkknorpelregeneration.....	20
1.3.3 Zellquellen für zellbasierte Therapiestrategien.....	21
1.3.3.1 Primäre humane Chondrozyten	21
1.3.3.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und deren chondrogene Differenzierung <i>in vitro</i>	22
1.3.4 Leitschienen (Scaffolds).....	24
1.3.5 Leitschienenfreie Ansätze	25
1.3.6 Leitschienenfreie Membrankultur	25
1.4 Aufgabenstellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Laborgeräte.....	27
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien.....	28
2.1.3 Zellkultur	29
2.1.4 Histologie und Immunhistologie	31
2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.1.6 Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane	33
2.1.7 Software.....	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur	34
2.2.1.1 Allgemeine Zellkultivierung	34
2.2.1.2 Dreidimensionale Kultursysteme	37

2.2.1.2.1 Pelletkultur	37
2.2.1.2.2 Membrankultur	37
2.2.1.3 Primäre humane Chondrozyten (phC)	38
2.2.1.3.1 Zellgewinnung	38
2.2.1.3.2 Kulturmedien	39
2.2.1.3.3 Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen	40
2.2.1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	40
2.2.1.4.1 Zellgewinnung	40
2.2.1.4.2 Kultivierung in Monolayer	41
2.2.1.4.3 Osteogene Differenzierung in Monolayer	41
2.2.1.4.4 Adipogene Differenzierung in Monolayer	42
2.2.1.4.5 Chondrogene Differenzierung in dreidimensionalen Kultursystemen	43
2.2.2 Histologie und Immunhistologie	43
2.2.2.1 Einbettung der Gewebskonstrukte aus dreidimensionalen Kultursystemen	43
2.2.2.2 Anfertigung und Fixierung der Schnittpräparate	44
2.2.2.3 Histologie und Histochemie	44
2.2.2.4 Immunhistologie	46
2.2.2.4.1 Primärantikörper	46
2.2.2.4.2 Durchführung	46
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.3.1 Isolierung und Quantifizierung der RNA aus Zellen (Monolayer)	47
2.2.3.2 Isolierung und Quantifizierung der RNA aus dreidimensionalen Kultursystemen	48
2.2.3.3 Reverse Transkription	49
2.2.3.4 RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR)	50
2.2.3.5 QRT-PCR (Quantitative Real-Time-PCR, Light-Cycler®)	51
2.2.4 Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane	52
2.2.4.1 Quantifizierung des DNA-Gehalts aus dreidimensionalen Kultursystemen	52
2.2.4.2 Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts aus dreidimensionalen Kulturen	53
2.2.4.3 Statistische Auswertung	53
3 Ergebnisse	54
3.1 Kultivierung humaner Chondrozyten	54
3.1.1 Kultivierung in Monolayer	54
3.1.2 Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen	56
3.1.2.1 Makroskopische Erscheinung	56
3.1.2.2 Histologie und Immunhistologie	56
3.1.2.3 Relative Quantifizierung der Kollagen-Typ-II-Expression	58

3.2 Osteogene und adipogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen	59
3.2.1 Osteogene Differenzierung	59
3.2.2 Adipogene Differenzierung.....	60
3.3 Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Kultursystemen	62
3.3.1 Kultivierung in Monolayer	62
3.3.2 Makroskopische Erscheinung	63
3.3.2.1 Membrankulturen.....	63
3.3.2.2 Pelletkulturen	64
3.3.3 Histologie und Immunhistologie	64
3.3.3.1 Membrankulturen.....	64
3.3.3.2 Pelletkulturen	67
3.3.3.3 Histologisches Grading nach dem Bern-Score	68
3.3.4 Expression kartilaginärer Marker	69
3.3.5 Glykosaminoglykangehalt	70
4 Diskussion	72
4.1 Chondrogenes Potential humaner Chondrozyten in dreidimensionalen Kultursystemen	72
4.1.1 Isolierung primärer humaner Chondrozyten aus adultem Gelenkknorpel	72
4.1.2 Dedifferenzierung primärer humaner Chondrozyten in Monolayer-Kultur	72
4.1.3 Kultivierungs- und Redifferenzierungskapazität dreidimensionaler Kultursysteme	72
4.2 Chondrogenes Potential humaner mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Kultursystemen	74
4.2.1 Nachweis der Stammzellplastizität.....	74
4.2.2 Präinkubation mit FGF-2	75
4.2.3 Einfluss des dreidimensionalen Kultursystems	75
4.2.4 Einfluss der Wachstumsfaktorkombinationen	77
4.3 Chondrogenität der Membrankultur.....	81
4.3.1 Dreidimensionalität, hohe initiale Zelldichte und Mikromilieu	81
4.3.2 Zelluloseazetatmembran und Ernährung durch Diffusion	82
4.3.3 O ₂ -Gehalt und Kontakt zur Atmosphäre.....	83
4.3.4 Leitschienenfreie Kultivierung und Differenzierung	85
4.3.5 Größe und Möglichkeit der Implantation	86
4.4 Wertigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen zur Regeneration des Gelenkknorpels	88
5 Zusammenfassung.....	91

6 Literaturverzeichnis	93
Abkürzungsverzeichnis.....	112
Danksagung	114

1 Einleitung

1.1 Hyaliner Gelenknorpel

1.1.1 Vorkommen und allgemeine Eigenschaften

Hyaliner Knorpel findet sich neben seinem Vorkommen in den Atemwegen (Nase, Larynx, Trachea und Bronchien) sowie an den Sternum- und Bogenabschnitten der Rippen vor allem als hyaliner Gelenknorpel in den synovialen Gelenken. Während der Fetalentwicklung spielt er durch die Bildung eines transienten Knorpelskeletts im Rahmen der chondralen Ossifikation eine entscheidende Rolle. Er dient außerdem in den Epiphysenfugen dem Längenwachstum der Röhrenknochen [1,2].

Reifer Gelenknorpel ist ein hypozelluläres, aneurales, alymphatisches und avaskuläres Bindegewebe. Es handelt sich um ein druckelastisches, zugfestes und zu reversibler Deformation fähiges Stützgewebe [3]. Der Gelenknorpel ermöglicht durch seine spezifische Zusammensetzung, die Interaktion seiner Bestandteile sowie die strukturelle Organisation und Architektur ein nahezu reibungsfreies Gleiten artikulierender Gelenkflächen der Diarthrosen und die gleichmäßige Verteilung und Absorption auf ihn wirkender Kräfte. So ist eine schmerzfreie und uneingeschränkte Gelenkbewegung möglich [3,4].

1.1.2 Chondrogenese

Das Skelettsystem entwickelt sich aus dem überwiegend aus dem mittleren Keimblatt (~ Mesoderm) entstehenden Mesenchym, einem embryonalen, avaskulären Bindegewebe. Das axiale Skelett mit Wirbelkörpern und Rippen geht aus dem Sklerotom der Somiten hervor, das Extremitätenskelett aus dem lateralen Plattenmesoderm [5]. Die Knochen der Extremitäten werden zunächst knorpelig angelegt und im Rahmen der enchondralen Ossifikation schrittweise durch Knochen ersetzt. Der Gelenknorpel verbleibt als permanenter Überrest dieses hyalinen Knorpels, geht also aus dem Mesenchym der distalen Knochenenden hervor. Die Chondrogenese stellt somit einen frühen Schritt der Skelettentwicklung dar.

Der Prozess der Chondrogenese beginnt mit der Rekrutierung, Migration und Proliferation embryonaler mesenchymaler Stammzellen und dem sog. „*Commitment*“ (Festlegung) zu mesenchymalen Chondroprogenitorzellen [6]. Ab der fünften Schwangerschaftswoche bilden sich in der Kondensationsphase Verdichtungen mesenchymaler Stammzellen, kondensierte Cluster hoher Zelldichte [7]. Der Kondensationsprozess der Zellen wirkt im Rahmen der Chondrogenese und damit auch der Formation enchondraler Skelettelemente wie eine Leitschiene [7]. In den kondensierten Chondrifikationszentren bilden die Zellen intensive intermesenchymale und epithelio-mesenchymale Zell-Zell-Kontakte aus [8,9]. Die hohe initiale Zelldichte scheint dabei Voraussetzung der Chondrogenese zu sein, wobei die Höhe der Zelldichte das Ausmaß der Chondrogenese bei *In-vitro*-

Versuchen beeinflusst [10,11]. Ein entscheidender Wachstumsfaktor während der Kondensationsphase ist TGF- β [6].

Die mesenchymalen Chondroprogenitorzellen differenzieren in proliferierende Chondroblasten und nehmen sphärische, rund-ovale Formen an [12]. Die Zellen sezernieren Matrixproteine und trennen sich so durch Akkumulation der entstehenden extrazellulären Matrix (EZM). Unter den knorpelspezifischen EZM-Genen, die in diesem Differenzierungsprozess zunehmend exprimiert werden, ist auch das Kollagen-Typ-II-Gen (COL2A1). Die Zellen produzieren verstärkt Aggrecan, Link-Protein sowie die Kollagene vom Typ IX und XI [13]. Im weiteren Verlauf differenzieren die Zellen zu reifen Chondrozyten, die Proliferation kommt beim Übergang zu prähypertrophen Chondrozyten zum Stillstand. Die Zellen beginnen zunehmend mit der Expression des Kollagens Typ X und supprimieren nach und nach die Expression des Kollagens Typ II und des Aggrecans.

In dieser späten Phase der Knorpeldifferenzierung kommt es zur Hypertrophierung der Zellen. Solche terminal differenzierten Chondrozyten findet man typischerweise in den Epiphysenfugen der langen Röhrenknochen und in der Zone des kalzifizierten Knorpels (Abb. 3). Sie weisen auf eine beginnende Verkalkung hin. Hypertrophierte Chondrozyten werden nach Apoptose durch Osteoblasten ersetzt oder können vereinzelt in diese transdifferenzieren [13,14]. Der Prozess der enchondralen Ossifikation zur Formation langer Röhrenknochen beinhaltet die terminale Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten, die Kalzifizierung der EZM, die Vaskularisation und Ossifikation. Der Prozess der (Prä-) Hypertrophierung geht dabei mit vermehrter Expression des Kollagen-Typ-X-Gens (COL10A1) einher. Regulatoren dieses Prozesses sind Indian Hedgehog (Ihh) und das Parathyroid-hormone-related Peptide (PTHrP).

In der Differenzierung der den Gelenkknorpel bildenden Chondrozyten endet der Differenzierungsprozess mit dem Abschluss des skelettalen Wachstums. Die metabolische Aktivität und die Matrixsynthese nehmen ab. Die Chondrozyten teilen sich in reifem, gesundem Gelenkknorpel nun nicht mehr [15]. Die kontinuierliche Aktivität der Chondrozyten dient nun dem Erhalt des Gewebes. Chondrozyten des reifen Gelenkknorpels außer denen der „Tide mark“ (1.1.4, Abb. 3) hypertrophieren nicht. Die Hypertrophierung wird verhindert, indem der erreichte Differenzierungsstatus durch verschiedene Faktoren wie den niedrigen O₂-Gehalt, eine Reihe von Wachstumsfaktoren und ihre Inhibitoren sowie die mechanische Stimulation im Rahmen der Gelenkbewegung mit konsekutiver Mechanotransduktion stabilisiert wird [13,16,17].

Der gesamte Prozess der Chondrogenese wird durch die Wirkung von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren sowie Proteasen gesteuert und modifiziert sowie durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen reguliert (Abb. 1). Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind neben ihren Eigenschaften als multifunktionelle Regulatoren verschiedener Zellarten wie Osteoblasten, Chondroblasten, epithelialen oder neuralen Zellen im Rahmen des Zellwachstums, Differenzierung und Apoptose entscheidende Signalmoleküle im Zuge der Chondrogenese. Aktivierung des TGF- β -Rezeptors führt zur Aktivierung

verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden [7]. Die Balance zwischen TGF- β - und FGF-Liganden und ihren Rezeptoren reguliert die Proliferationsrate und den Differenzierungsprozess der Zellen [18]. Reife Chondrozyten exprimieren FGF-2, welches ein potentes Mitogen für Chondrozyten darstellt [19]. Auch IGF-1 spielt eine entscheidende Rolle (1.3.3.2), indem es insbesondere wie TGF- β die Matrixsynthese steigert und deren Abbau hemmt [20,21]. IGF-1 wirkt wie FGF-2 mitogen. In der frühen Phase der Chondrogenese sind außerdem Glukokortikoide für die Induktion einer potenten Chondrogenese essentiell, insbesondere, wenn die initiale Zelldichte der Progenitorzellen hoch genug ist, um die intrazellulären Steroidrezeptoren aufzuregulieren [22,23].

Zentrale Bedeutung in der Chondrogenese hat der Transkriptionsfaktor SOX9 (Sry-related High Mobility Group Box 9), dessen Mutation zur Kampomelie führen kann [24]. SOX9 wird während der Embryogenese in zum Skelett reifenden Strukturen exprimiert, insbesondere in mesenchymalen Chondroprogenitorzellen im Zuge der Kondensationsphase sowie in Chondroblasten und Chondrozyten. Er aktiviert Promotorelemente knorpelspezifischer Zielgene wie den Genen von Kollagen Typ II (COL2A1), Aggrekan und Kollagen Typ XI bzw. wird mit Zielgenen wie dem des Kollagen Typ II koexprimiert. In hypertrophen Chondrozyten wird die Expression supprimiert [25-28].

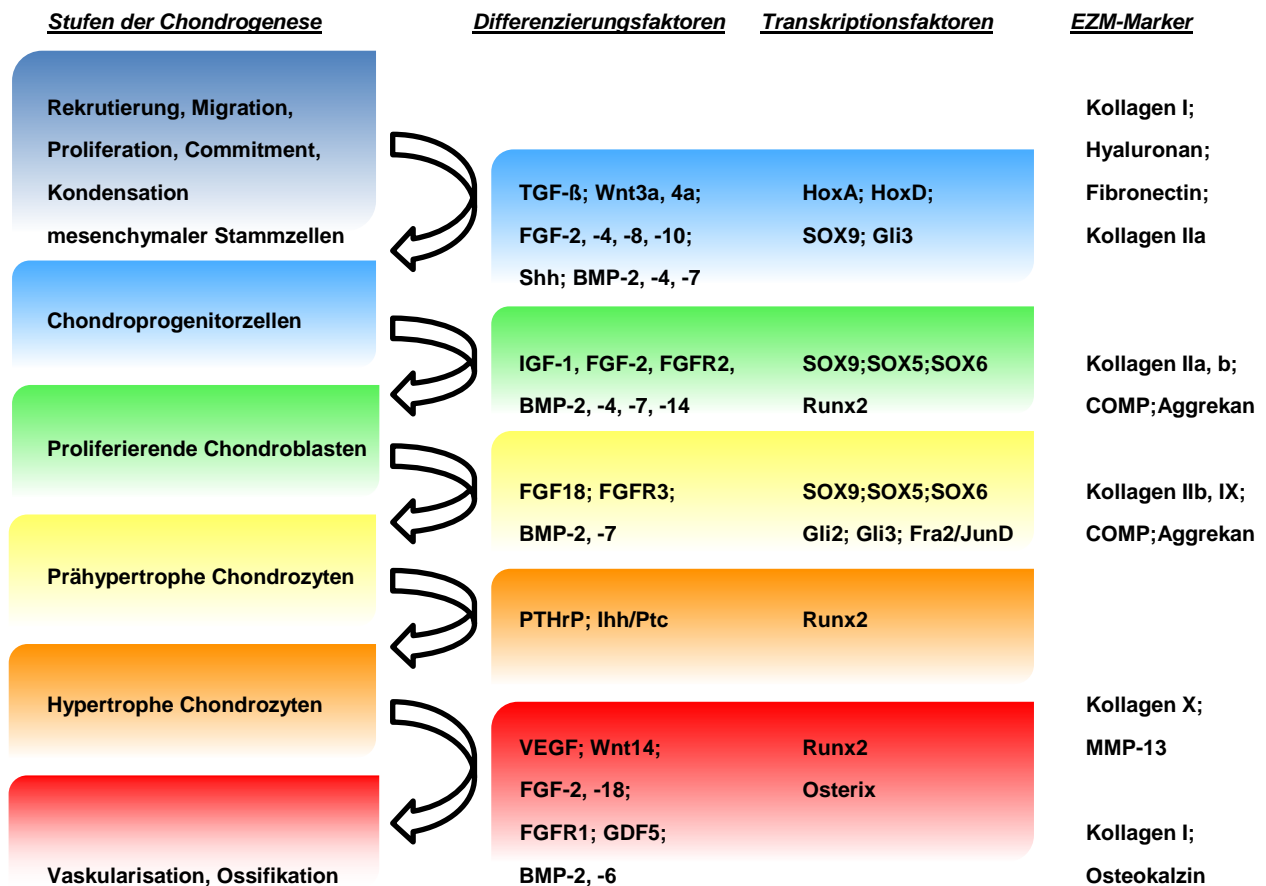


Abb. 1 Schematische Darstellung der chondrogenen Zelldifferenzierung im Rahmen der Entwicklung langer Röhrenknochen *in vivo*. Dargestellt sind die einzelnen

Differenzierungsschritte samt ausgewählter, beteiligter Differenzierungs- und Transkriptionsfaktoren sowie charakteristischer Marker der EZM. Modifiziert nach [6,29,30].

1.1.3 Zusammensetzung und Organisation

Gelenkknorpel besteht wie alle Binde- und Stützgewebe aus Zellen und EZM, welche wiederum aus Grundsubstanz und Kollagenen sowie elastischen Fasern zusammengesetzt ist [1].

Die Zellen des Gelenkknorpels entsprechen circa 1–10 % des Gewebsvolumens [31,32]. Es lassen sich teilungsfähige Chondroblasten von postmitotischen Chondrozyten unterscheiden. Letztere sind die spezifischen Zellen reifen Knorpelgewebes, welche im adulten Gelenkknorpel nicht nur zum Erhalt des Gewebsvolumens die EZM synthetisieren, sezernieren und exakt geordnet organisieren, sondern auch deren Abbau durch Sekretion verschiedener Metalloproteinasen (und deren Inhibitoren) sowie Endozytose und lysosomale Degradation regulieren [33]. Reifer Gelenkknorpel entspricht in dieser Hinsicht einem dynamischen System, dessen Zellen auf Änderungen in der Zusammensetzung der EZM bedingt reagieren können, um deren Integrität zu bewahren [34]. Sich teilende Chondroblasten bilden Cluster postmitotischer Chondrozyten aus, isogene Zellgruppen, die als Chondrone bezeichnet werden [35]. Diese bilden gemeinsam mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix die Territorien [36]. Die zwischen den Territorien gelegenen Matrixanteile werden Interterritorien genannt.

Gelenkknorpel besteht zu circa 90-99% aus EZM, welche für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist. Die Matrix wiederum besteht zu circa 80% aus Wasser und Ionen und zu 20% aus organischen Matrixmolekülen [37]. Letztere lassen sich aufteilen in Kollagene (circa 80%) und andere nicht-fibrilläre organische Matrixmoleküle (20%) wie Proteoglykane und andere Glykoproteine.

Kollagene sind hauptsächlich (90%) vom Typ II, zu geringem Anteil (10%) auch von den Typen VI, IX, X und XI. Kollagen Typ II besteht aus drei identischen helikalen α -Ketten und bildet den Hauptteil des Fasergerüsts [35]. Kollagen vom Typ X hat eine wichtige Aufgabe in der Mineralisation des Knorpels. Hypertrophe Chondrozyten exprimieren und sezernieren größere Mengen des Kollagens Typ X, das v.a. perizellulär deponiert wird [38]. Lediglich in Spuren sind die Kollagene vom Typ I, III, V und XIV nachweisbar [39].

Proteoglykane sind Glykoproteine, die aus einem fadenförmigen, zentralen Kernprotein (*core protein*) bestehen, an welches Seitenketten aus Glykosaminoglykanen angehängt sind. Diese Glykosaminoglykane sind lineare Polysaccharide aus repetitiven Disaccharideinheiten. Zu ihnen gehören Hyaluronsäure sowie Chondroitin-, Keratan- und Dermatansulfat [40]. Hyaluronsäure stellt das Gerüst der Grundsubstanz dar. Vor den kleinen Proteoglykanen wie Biglykan, Dekorin, Fibromodulin und Perlekan ist Aggrekan als großes Proteoglykan das häufigste. Es ist über seine G1-Domäne und das Bindeprotein (Link-Protein, Hyaluronectin) an fadenförmige Hyaluronsäuremoleküle gebunden [41-43]. Ein

Aggrecanmolekül besitzt ein filiformes Kernprotein, von welchem flaschenbürstenartig angeordnete Glykosaminoglykseitenketten ausgehen (Abb. 2). Es handelt sich u.a. wegen der Sulfatgruppen um Polyanionen, die die gegenseitige Abstoßung der Seitenketten bewirken und eine hohe Bindungskapazität für Wasser und hydratisierte Kationen ermöglichen. Die polyanionischen Eigenschaften bewirken ferner die Bindung kationischer Farbstoffe wie Alzianblau oder Toluidinblau bei histochemischen Färbungen [1]. Schließlich binden Proteoglykane die für Differenzierungsvorgänge wichtigen Wachstumsfaktoren wie TGF- β und FGF-2, eine Bindung, die die Affinität der Wachstumsfaktoren zu ihren Rezeptoren erhöht [44]. Andere Glykoproteine der Knorpelmatrix enthalten lediglich kurze Kohlenhydratseitenketten und spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Chondrozyten in der Matrix. Zu den häufigen Glykoproteinen gehören das zur Thrombospondin-Familie gehörende COMP, welches pentamere Komplexe bildet und beinahe ausschließlich im Knorpel exprimiert wird [45]. Es bindet Kollagene vom Typ I, II und IX sowie Matriline [45-47]. COMP katalysiert die frühe Kollagenfaserformation und bewerkstelligt die Interaktion der Fasern [48]. Allerdings führen hohe Relationen des COMP zu (Pro-)Kollagen, wie sie für Arthrose typisch sind, zu einer Sättigung der Bindungsstellen und somit zu beeinträchtigter Fibrillogenese sowie vermindertem Reparaturvermögen [45]. Neben seiner (katalytischen) Funktion während der frühen Fibrillogenese dient COMP in reifem Knorpel der Stabilisierung des Kollagennetzwerks.

Die Interpendenz zwischen Chondrozyten und EZM ermöglicht durch Regulierung der metabolischen Aktivität der Zellen das Aufrechterhalten des Gewebes unter Umständen für das gesamte Leben. An der Chondrozytenoberfläche befindliche Proteine binden an Bestandteile der EZM wie Kollagen Typ II oder Hyaluronsäure [49-51]. Des Weiteren besitzen einige Chondrozyten kurze Zilien, die in die EZM ragen, denen die Registrierung mechanischer, elektrophysiologischer und physikochemischer Reize zugeschrieben wird [38,52-54]. Frequenz und Intensität der mechanischen Belastung beeinflusst entscheidend den Metabolismus. Sämtliche Interaktionen zwischen Zelle und EZM bestimmen so unter Einbeziehung der Zytokinwirkungen die metabolische Zellaktivität und damit auch den Matrixumsatz.

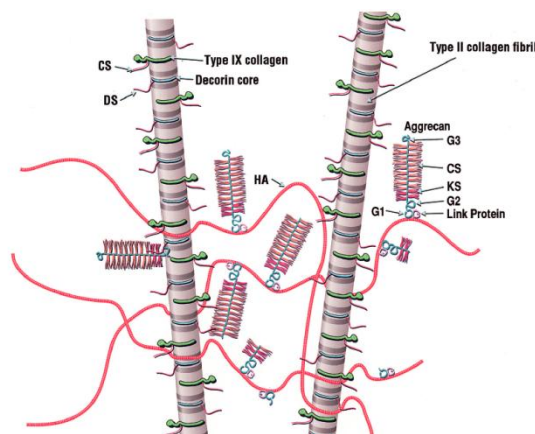


Abb. 2 Schematische Darstellung der molekularen Zusammensetzung und der Interaktion der Bestandteile des Gelenkknorpels (Details, s. Text). Aus [45].

1.1.4 Architektur und Funktion

Hinter der makroskopisch homogen-festen, weiß-bläulich glänzenden Erscheinung des reifen Gelenkknorpels verbirgt sich mikroskopisch eine hochgradig geordnete, komplexe Architektur. Zum einen liegt in reifem Gelenkknorpel eine *regionale Gliederung* der die Chondrozyten umgebenden EZM vor (1.1.3), zum anderen zeigt sich lichtmikroskopisch im vertikalen Schnitt eine oberflächenparallele *Zonengliederung* von der Knorpeloberfläche bis zum subchondralen Knochen.

Je nach Entfernung von den Zellen zeigt die EZM eine *regionale Gliederung* bzw. Organisation auf. Die unmittelbare perizelluläre, amorphe Umgebung, die bis zu 2 µm dicke perizelluläre (lakunäre) Matrix, ist reich an Aggrecan und Decorin, an Kollagen Typ VI und Hyaluronsäure [43,55]. Daran angrenzend befindet sich die territoriale (kapsuläre) Matrix, die durch ein dichtes, korbartiges Netzwerk quervernetzter Kollagenfasern von 10–20 nm Dicke gekennzeichnet ist und Chondrozyten bzw. Chondrone einfasst [56]. Diese beiden Matrixregionen dienen der Verbindung der Chondrozytenmembranen mit den Makromolekülen der EZM sowie dem Schutz der Zellen vor Schaden bei mechanischer Belastung und Deformierung des Gewebes. Des Weiteren vermitteln sie die mechanischen Signale für Chondrozyten im Rahmen der Gelenkbelastung [38]. Den größten Anteil der EZM stellt die interterritoriale Matrix dar, die den Großteil der Proteoglykane und Kollagenfasern enthält. Sie vermittelt die mechanischen Eigenschaften.

In der *Zonengliederung* lassen sich Superficial-, Transitional- und Radialzone sowie kalzifizierter Knorpel unterscheiden (Abb. 3), die durch Verteilung und Anordnung der Kollagenfasern voneinander unterschieden werden können [43,57]. Auch die Zusammensetzung und der Gehalt der restlichen EZM-Bestandteile sowie chondrozytäre Eigenschaften variieren in Abhängigkeit vom Abstand zur Knorpeloberfläche. Chondrozyten unterscheiden sich dabei in Form, Größe, metabolischer Aktivität und Anordnung in den verschiedenen Zonen [58-60]. Unterschiede in diesen Subpopulationen werden auf die verschiedenen mechanischen Beanspruchungen der Zonen zurückgeführt [57,61].

Die oberflächliche, dünne Superficial- oder Tangentialzone ist gekennzeichnet durch einen zur Knorpeloberfläche tangentialen Verlauf der zahlreichen, dünnen Fasern mit der mechanischen Belastung entsprechender trajektoriieller Ausrichtung. Die Superficialzone besitzt die höchste Zugfestigkeit, um Scherkräften während der Gelenkbewegung standhalten zu können [62]. Die Konzentration an Kollagenfasern sowie Decorin und Biglykan ist hoch, die des Aggrecans niedrig [63]. Das dichte Faserwerk bedeutet eine gewisse Barriere für die Diffusion von Makromolekülen (z.B. Antikörper). Hierdurch wird der Gelenkknorpel vom Immunsystem in gewissem Ausmaß abgeschirmt [38]. Die Chondrozyten sind klein und spindelförmig-abgeflacht. Sie verlaufen parallel zur Oberfläche und sind im Wesentlichen Zugkräften ausgesetzt.

Die Transitional- oder Übergangszone zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Matrixbestandteilen aus, insbesondere an Aggrecan. Daher sind die hier scheinbar zufällig angeordneten, sich teilweise kreuzenden, dicken Kollagenfasern weiter voneinander entfernt. Die Chondrozyten sind ovalärer Morphologie und schräg

angeordnet. Sie treten einzeln oder in Paaren auf. Verglichen mit der Superficialzone sind die Zellen metabolisch aktiver. Im Vergleich zur tiefen Radialzone sind Zelldichte und Zellvolumen größer.

In der tiefen Radialzone sind sowohl Kollagenfasern als auch Chondrozyten radial zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die Zellkonzentration bezogen auf die extrazelluläre Matrix ist geringer als in der Transitionalzone. Die Chondrozyten sind rundlich konfiguriert und säulenartig angeordnet. Sie sind im Wesentlichen Druckkräften ausgesetzt. Kollagenfaserdurchmesser und Proteoglykankonzentration sind am größten, die Wasserkonzentration am geringsten. Die Kollagenfasern ziehen am Grund der tiefen Radialzone in die Grenzlinie (*Tide mark*), eine dünne basophile Linie zwischen tiefer Radialzone und Zone des kalzifizierten Knorpels.

Die Kollagenfasern sind in der Zone des kalzifizierten Knorpels verankert, die von Hydroxyapatitkristallen durchzogen ist. Diese Zone stellt die Verbindung des Gelenkknorpels mit dem subchondralen Knochen dar. In ihr finden sich wie in der Epiphysenfuge hypertrophe Chondrozyten [38].

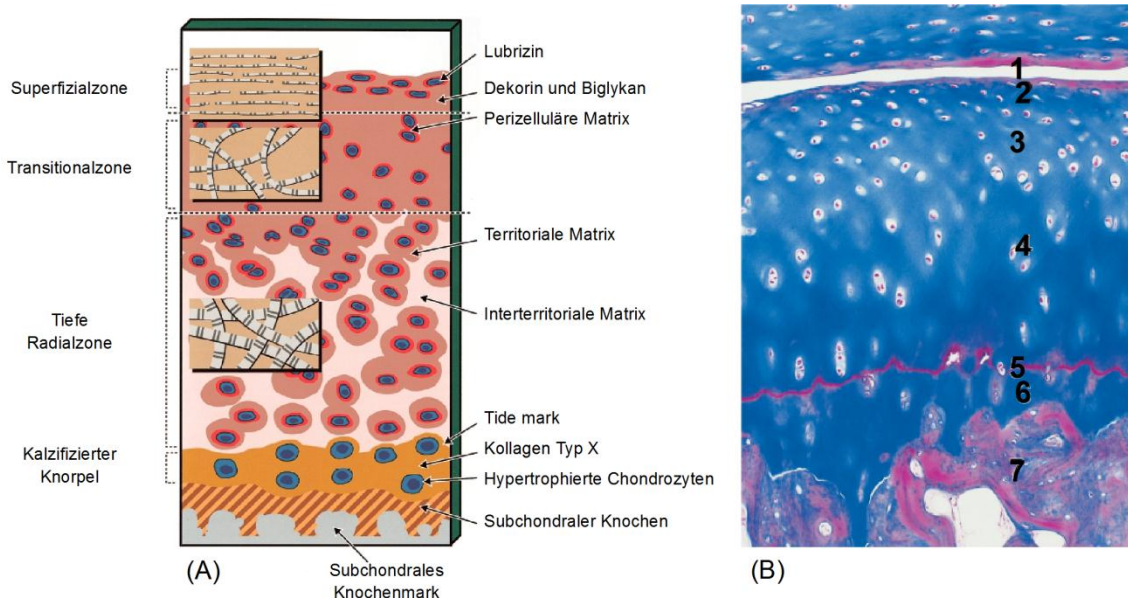


Abb. 3 Schematische (A) und histologische (B) Darstellung eines Vertikalschnitts durch den Gelenkknorpel. (A) Dargestellt sind die Zonen des Gelenkknorpels mit spezifischen Matrixregionen und und typischerweise exprimierten EZM-Molekülen (regionale und zonale Gliederung). Die Einsätze zeigen die Anordnung der Kollagenfasern. Modifiziert nach [43]. (B) Masson-Trichrom-Färbung eines Schnitts durch ein menschliches Fingergelenk (250x). 1 Gelenkspalt; 2 Superficialzone; 3 Transitionalzone; 4 Tiefe Radialzone; 5 Grenzlinie (*Tide mark*); 6 Zone des kalzifizierten Knorpels; 7 Subchondraler Lamellenknochen. Aus [2].

Zur Entstehung dieser Gliederung und Organisation gibt es verschiedene Vorstellungen, die genauen Mechanismen dieser strukturellen Transformation sind jedoch unbekannt (1.1.2). Reifer Gelenkknorpel ist gekennzeichnet durch die oben beschriebene, hochgradig strukturelle Anisotropie. Unreifer Knorpel zum Zeitpunkt der Geburt und während der frühen postnatalen Wachstumsperiode zeigt hingegen eine ungeordnete, isotrope Faseranordnung [35,64] (Abb. 4). Eine Hypothese zur

Anordnung dieser Isotropie im Laufe des Wachstums besagt, dass dieser Prozess nicht durch internes Gewebsremodeling, sondern durch Resorption und Neoformation von statten geht [65]. Dieser Prozess der postnatalen Reorganisation bedeutet, dass das Nachvollziehen der Chondrogenese *in vitro* allein nicht dazu führen kann, einen strukturell intakten Gelenkknorpel hoher Anisotropie generieren zu können [65].

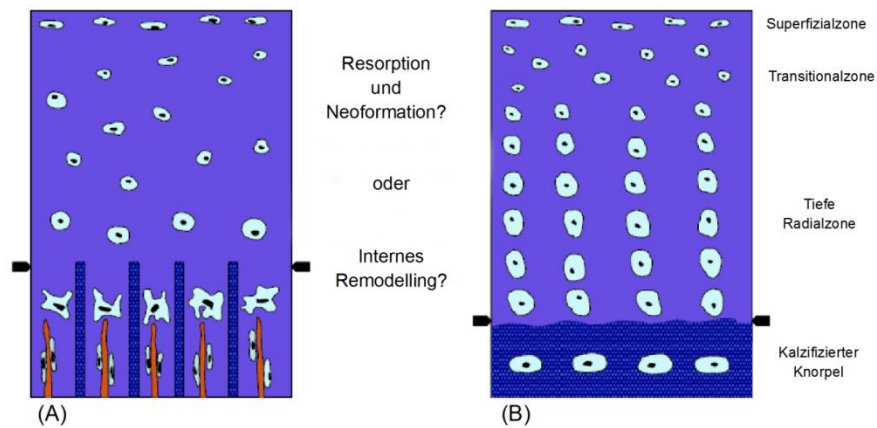


Abb. 4 Schematischer Vergleich der lichtmikroskopischen Struktur unreifen (A) und reifen Gelenkknorpels (B) im Vertikalschnitt. Während des fetalen und frühen postnatalen Lebens sind Chondrozyten zufällig heterogen (isotrop) verteilt. Allerdings ist als Trend erkennbar, dass in der Nähe der Knorpeloberfläche gelegene Chondrozyten klein und abgeflacht erscheinen. Die Pfeile markieren die Kalzifizierungsgrenze (*Tide mark*). Nach [65].

Gelenkknorpel ist ein viskoelastisches Gewebe. Er ist bis zu einem gewissen Grade durch Druck-, Zug- und Biegunskräfte komprimier- und dehnbar [38]. Der Gelenkknorpel funktioniert dabei nach dem Prinzip eines Faser-verstärkten Werkstoffs. Die polyanionischen Eigenschaften der EZM-Makromoleküle (1.1.3) verursachen große repulsive Kräfte und einen hohen endosmotischen Druck durch eine hohe Kationenkonzentration, die mit einer hohen Gesamtkonzentration anorganischer Ionen wie Natrium und Kalzium in der Gewebsflüssigkeit einhergeht (*Donnan-Effekt*). Diese schwellenden Effekte werden durch das Kollagennetzwerk aufgefangen und erhöhen den Quelldruck weiterhin, indem Proteoglykane, insbesondere Aggrekan, auf einen Bruchteil (ca. 20 %) seines voll hydratisierten Volumens (*free-swelling volume*) komprimiert werden. Dies alles generiert die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, durch welche punktförmiger mechanischer Stress auf den subchondralen Knochen verhindert wird [32,38,66].

Die Herstellung von Gelenkknorpel im Sinne des Tissue Engineering (1.3) erfordert daher insbesondere mit Blick auf die zu erreichenden mechanischen Eigenschaften nicht nur die Erzeugung korrekter Konzentrationen und Verhältnisse der richtigen Komponenten des Gewebes, sondern auch die Rekonstruktion der hochorganisierten Struktur [38].

1.1.5 Ernährung und Stoffaustausch

Ernährung und Elimination von Stoffwechselprodukten des Gelenkknorpels erfolgt durch Diffusion aus den bzw. in die subchondralen Kapillarplexus und aus der bzw. in die Synovialflüssigkeit [32,56]. Die Knorpelmatrix stellt dabei hinsichtlich Größe, Ladung und anderen Eigenschaften wie molekularer Konfiguration eine Diffusionsbarriere dar [67]. Dies bedeutet für Chondrozyten einen Zustand relativer Hypoxie. In tieferen Schichten des Gelenkknorpels liegt der O₂-Gehalt bei circa 1% [68]. Der Stoffwechsel ist aufgrund dieser hypoxischen Umgebungsbedingungen anaerob-glykolytisch [56]. Dieser Stoffwechselweg wird selbst bei aeroben Zellkulturbedingungen *in vitro* bevorzugt eingeschlagen [69]. Aufgrund der insgesamt niedrigen metabolischen Aktivität des Gewebes bei geringer Zelldichte wird Gelenkknorpel gemeinhin als bradytroph bezeichnet. Allerdings ist die glykolytische Rate der einzelnen Zelle des Gelenkknorpels derjenigen von Bindegewebszellen vaskularisierter Gewebe gleich, so dass Chondrozyten individuell betrachtet als metabolisch aktiv zu bezeichnen sind [38]. Gelenkknorpel ist circa 10 Millionen Zyklen Gelenkbelastung pro Jahr ausgesetzt [70]. Durch intermittierende Druckbelastung des Knorpels durch diese Gelenkbewegung wird die Konvektion der Nährstoffe einschließlich Wachstumsfaktoren durch das Gewebe entscheidend verbessert. Während der Gelenkbelastung und -entlastung erfolgt eine zyklische Redistribution der Gewebsflüssigkeit. Wird der Knorpel belastet, erfolgt in diesem Bereich das Auspressen der Gewebsflüssigkeit mit Erhöhung der Dichte negativer Ladungen und Steigerung des Quelldrucks. Bei Entlastung dieser Knorpelzone erfolgt daher rasch der Einstrom der Gewebsflüssigkeit und die Wiederherstellung der vorherigen Gewebskonfiguration. So können Immobilisation und verminderte Gelenkbelastung zur Überschreitung matrixsynthetischer durch matrixdegradierende Vorgänge führen [71].

1.1.6 Gelenkknorpeldefekte

„Once destroyed, is not repaired“: Bereits 1743 stellt der Chirurg William Hunter fest, „ulzerierter Knorpel sei eine sehr schwere Erkrankung, welche eine Heilung mit größerer Schwierigkeit zulasse als ein kariöser Knochen und welcher – einmal zerstört – niemals gesunde“ [72]. Postnataler Gelenkknorpel besitzt kaum Fähigkeit zur spontanen Regeneration [73]. Die residenten Chondrozyten sind zu keinem suffizienten Reparaturprozess in der Lage und der Gelenkknorpel scheint keine ausreichenden Kapazitäten für die Rekrutierung vorhandener Progenitorzellen aus der Superficialzone oder der Synovia zu besitzen [74-76]. So stellen Gelenkknorpelverletzungen meist einen irreversiblen Knorpeldefekt dar [77,78]. Insbesondere durch das Fehlen von Blutgefäßen unterscheidet sich die Reaktion des Gelenkknorpels auf eine Verletzung von der vaskularisierten Bindegewebe, wie beispielsweise durch die Migration inflammatorischer Zellen. Umschriebene Gelenkknorpeldefekte entstehen im Gegensatz zur primären chronisch progressiven Degeneration des Knorpels (Osteoarthritis) infolge eines Traumas, häufig im

Zusammenhang mit weiteren komplexen Binnenverletzungen, oder einer Nekrose (z.B. Osteochondrosis dissecans). Solche umschriebenen Defekte mehrerer mm² werden nicht durch Reparationsgewebe ersetzt, allerdings kann von bis in den subchondralen Knochen reichenden Läsionen faserknorpeliges, allerdings mechanisch minderwertiges Ersatzgewebe gebildet werden. Letzteres ist bei größeren Defekten außerdem ebenfalls dem Untergang geweiht [79]. Dies und der Verlust der strukturellen Integrität der Knorpeloberfläche erhöht signifikant das Risiko für die Entwicklung einer (sekundären) Osteoarthrose [80,81]. Beim älteren Menschen sinkt ferner das Regenerationspotential durch abnehmende chondrozytäre Kapazität zur Synthese von Proteoglykanen sowie ein verringertes Ansprechen auf mechanische Stimuli und Wachstumsfaktoren weiter ab [38].

Aktuelle Schätzungen zur Prävalenz fokaler Knorpeldefekte liegen zwischen 5 % und 11 % für jüngere und bei bis zu 60 % für ältere Patienten [82-84]. Auch wenn die Latenzzeit zwischen Gelenkstrauma und Entstehung der sekundären Arthrose interindividuell schwankt, wird nicht selten früher oder später die Implantation einer Endoprothese erforderlich. Um diesen Eingriff bei jungem Patientengut zu verhindern, ist die biologische, autologe Regeneration des Knorpeldefekts ein neuartiger Ansatz und eine wertvolle Option, um dem oft jungen Alter und dem hohen Anspruch an Mobilität der Patienten gerecht werden zu können.

1.2 Humane mesenchymale Stammzellen

1.2.1 Eigenschaften

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind dem Mesoderm entstammende multipotente Stammzellen, d.h. Zellen, die in bestimmte, nicht jedoch alle Zellen bzw. Gewebe differenzieren können. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine heterogene Population stromaler Stammzellen, die die Eigenschaften der Selbsterneuerung, Multipotenz und Differenzierungsfähigkeit in Zellen mesodermaler Gewebe (Knochen, Fett, Knorpel, Muskel, Sehnen und Bänder) sowie andere embryonale Entwicklungslinien, darunter hepatogene, neurogene und epitheliale Differenzierungskaskaden aufweisen [85-87]. Neuere Forschungsergebnisse zeigen ferner neben diesen Differenzierungseigenschaften immunmodulatorisches, antiinflammatorisches und trophisches Potential [88-90]. Analog zum Konzept der Hämatopoese des Knochenmarks wurden im Laufe des vergangenen Jahrhunderts Hypothesen entwickelt, dass die mesenchymalen Zellenarten des Knochenmarks aus einer Stammzelle hervorgegangen seien, was von Caplan als Mesengenes bezeichnet wurde [91]. HMSC konnten im adulten Organismus in annähernd allen postnatalen Organen nachgewiesen werden [92-94], u.a. im Knochenmark, in peripherem und Nabelschnurblut, in Muskel- und Fettgewebe, Knochen samt Periost, Gelenkknorpel, Sehnen und Bändern, Synovialflüssigkeit und Haut. HMSC aus verschiedenen Organen zeigen interessanterweise bei gleichen Kulturbedingungen *in vitro* deutliche Unterschiede im Expansions- und Differenzierungspotential [95]. Im

Allgemein erfolgt ihre Isolierung aus dem Knochenmark, seltener aus dem Fettgewebe oder der Nabelschnur bzw. dem Nabelschnurblut [85,93,96]. hMSC besitzen eine hohe Proliferationskapazität und können so *in vitro* über viele Kultivierungspassagen auf ein Vielfaches expandiert werden, ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren, was als hohes Selbsterneuerungspotential oder Plastizität bezeichnet wird [97].

hMSC besitzen keinen spezifischen Oberflächenmarker, der verlässlich für ihre Isolierung, Aufreinigung und Identifizierung verwendet werden könnte. Einen Überblick über die Kombination positiver, negativer und variabler Oberflächenmarker humaner mesenchymaler Stammzellen gibt Tab.1.

Oberflächenantigen positiv	Oberflächenantigen negativ	Oberflächenantigen variabel
Stro-1	CD11	CD10
ICAM-1	CD14	CD90
MHCI	CD18	Fli-1
CD13	CD31	
CD29	CD34	
CD44	CD40	
CD71	CD45	
CD73	CD56	
CD105	CD80	
CD106	CD86	
CD120	CD117	
CD124	CD133	
CD146	MHCII	
CD166		
CD271		

Tab. 1 Auf hMSC während der Isolierung regelmäßig identifizierte, nicht identifizierte und variabel identifizierte Oberflächenantigene [98,99].

Gold-Standard zum Nachweis des Stammzellcharakters der hMSC bleibt die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung *in vitro* [85], welche in der vorliegenden Arbeit durchzuführen war.

In vitro kultivierte hMSC adhären auf Plastikoberflächen, was bis heute unter spezifischen Medienbedingungen als entscheidender Selektionsfaktor bei der Isolierung genutzt wird [85,96]. Sie bilden dabei Fibroblasten-artige Kolonien aus. hMSC lassen sich unter geeigneten Bedingungen *in vitro* osteogen, adipogen und chondrogen [85] sowie tenogen [100,101] und myogen [102,103] differenzieren.

1.2.2 Differenzierung *in vitro*

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten osteogenen und adipogenen Differenzierungen finden *in vitro* in Monolayer-Kultur statt. Die chondrogene Differenzierung *in vitro* als Gegenstand der Arbeit ist im Abschnitt 1.3.3.2 en detail dargestellt.

Die methodischen Details der *In-vitro*-Osteogenese sind im Abschnitt 2.2.1.4.3 beschrieben. Der Nachweis ihrer erfolgreiche Durchführung kann zum einen durch den histochemischen Kalknachweis innerhalb der extrazellulären Matrix mit der von-Kossa-Färbung, zum anderen durch Nachweis der Expression osteoblastärer Marker wie Kollagen Typ I, Bone Sialoprotein (BSP), alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteonektin und Osteokalzin geführt werden [104].

Standard im Nachweis adipogen differenzierter hMSC, wie in Abschnitt 2.2.1.4.4 beschrieben, ist die Öl-Rot-Färbung, in der histochemisch intrazelluläre Lipidvakuolen zur Darstellung kommen. Marker der adipogenen Differenzierung sind die Expression des Adipogene Regulator Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR- γ), der die Osteogenese supprimiert, sowie Leptin [105,106].

1.3 Tissue Engineering humanen Gelenkknorpels

1.3.1 Grundlagen

Tissue Engineering ist die interdisziplinäre Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften zur Entwicklung biologischen Ersatzes, welcher der Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion dient [107,108]. Eine Vision und gleichzeitig biomedizinische Herausforderung ist es, „Ersatzteile“ aus körpereigenem Material herzustellen, wobei ein entscheidendes Feld dieser Forschungsarbeit in der *In-vitro*-Generierung menschlicher Gewebe und Organe zur Implantation in den Körper darstellt [109]. Tissue Engineering fußt auf drei entscheidenden Elementen (*tissue engineering triad*), (1) isolierten Zellen oder Geweben, die ggf. nach einem Differenzierungsprozess in der Lage sind, den spezifischen Phänotyp des Gewebes aufrecht zu erhalten oder zu generieren („seeds“), (2) Substanzen, die diese Zellen stabilisieren und in reife Gewebe differenzieren (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone; „fertilizer“) sowie (3) Leitschienen (Scaffolds) oder Matrices für eine drei-dimensionale Umgebung der Zellen („soil“) [110]. Diese müssen nicht in Kombination oder simultan eingesetzt werden [111].

Ziel ist, das Gewebe strukturell und funktionell zu rekonstruieren, wobei ein Ansatz zum Erreichen dieses Ziels um die zentrale Hypothese entwickelt wurde, dass dieser Prozess und das Verständnis desselben die Rekapitulation entscheidender Vorgänge embryonaler Entwicklung beinhaltet [112,113]. Neuere Ansätze stellen dabei Stammzell-basierte Versuche im Sinne einer *In-vitro*-Modulation der Chondrogenese zur Wiederherstellung reifer menschlicher Gewebe dar. Die zentrale

Idee des Tissue Engineerings von Knorpel sieht vor, dem Patienten Zellen zu entnehmen (Chondrozyten, Stammzellen, Fibroblasten), diese *in vitro* zu expandieren und ggf. unter Verwendung von Leitschienen oder ohne solche chondrogen zu differenzieren und anschließend das hergestellte Konstrukt in den Knorpeldefekt zu implantieren. Dabei ist derzeit Gegenstand klinischer Forschung, in welchem Differenzierungsstadium und in welcher Form Vorläuferzellen implantiert werden sollten, als Stammzellen oder ausdifferenzierte Zellen, als Suspension, leitschienenfreies Gewebe oder auf einer Leitschiene (Scaffold). Angestrebt wird die Herstellung für zellbasierte Therapiestrategien geeigneter Transplantate zur klinisch eingesetzten Gelenkknorpelregeneration.

1.3.2 Zellbasierte Therapiestrategien zur Gelenkknorpelregeneration

Zellbasierte Therapiestrategien wurden Ende der 1980er Jahre mit der Anwendung der autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT) eingeführt im Sinne einer dreistufigen Prozedur [114]. Dem Patienten werden aus gesunden Gelenkanteilen Knorpelbiopsien entnommen (1), *in vitro* anschließend Chondrozyten isoliert sowie expandiert (2) und hierauf als Zellsuspension in einem zweiten operativen Gelenkeingriff mit nachfolgender Deckung mit einem Periostlappen in den debridierten Knorpeldefekt injiziert (3). Indiziert ist die ACT bei umschriebenen Knorpeldefekten ab einer Fläche von vier cm² oder bei kleineren Defekten als Zweitlinienientherapie, wenn Methoden der Markstimulation (Mikrofrakturierung) erschöpft sind [115].

Probleme ergeben sich in der Donormorbidität im Rahmen der Biopsieentnahme, der geringen Zellzahl aufgrund der Hypozellularität reifen Gelenkknorpels, der Dedifferenzierung der isolierten Chondrozyten im Zuge der *In-vitro*-Expansion sowie der Bildung von minderwertigem Knorpelgewebe im Defekt.

Um diese Probleme zu lösen und die Qualität des Neoknorpels zu verbessern, wurden durch intensive Forschungsarbeit neue Techniken und Methoden mit neuen Biomaterialien und Leitschienen entwickelt. Bei der ACT der zweiten Generation wird statt der Periostlappendeckung eine Kollagenmatrix wie etwa die Kollagen-Typ I/III-Membran Chondro-Gide™ (Geistlich Biomaterials, Wolhausen, Schweiz) verwendet, was die chirurgische Morbidität und die Komplikationsrate für periostale Hypertrophie reduzierte [116,117]. Weitere wissenschaftliche Fortschritte führten zur Entwicklung der matrixgestützten ACT (MACT) der dritten Generation (von einigen Autoren auch als zweite Generation bezeichnet), bei der Biomaterialien als Leitschienen verwendet werden. Dieser Ansatz hat die Besiedelung dreidimensionaler Leitschienen mit isolierten, autologen Chondrozyten nach deren Expansion in Monolayer-Kultur oder unmittelbar nach Isolation zum Ziel. Das gewonnene Konstrukt wird der Größe des Knorpeldefekts angepasst und ohne Abdeckung implantiert. Hierfür stehen verschiedene Leitschienen auf Kollagen-, Hyaluron- und Polyglaktin- bzw. Polyglaktinbasis zur Verfügung [116]. Die Ansätze und Ideen der ACT der vierten (respektive dritten) Generation beinhalten chondroinduktive Leitschienen, *In-vitro*-Kulturbedingungen mit mechanischen Stimuli sowie innovative

Ansätze unter Verwendung von hMSC, Chondrozyten nach Gen-Transfer oder die Applikation rekombinanter oder autolog aufbereiteter Wachstumsfaktoren [116]. Die Sicherheit solcher innovativer Anwendungen muss im weiteren Verlauf geprüft werden [118].

Randomisierte Studien und Metaanalysen zur ACT zeigen insgesamt „gute“ bis „exzellente“ funktionelle Ergebnisse im Kniegelenk bei allerdings insgesamt insuffizienter Evidenz aufgrund der vorliegenden Studienqualität [81,115,119,120]. Für andere Gelenke wie Sprung-, Schulter-, Ellenbogen- oder Hüftgelenk existieren lediglich kleinere nicht-randomisierte Studien mit wenig Aussagekraft [115,121].

1.3.3 Zellquellen für zellbasierte Therapiestrategien

Die Produktion eines *in vitro* hergestellten Knorpelregenerats erfordert die Gewinnung und den Einsatz von Zellen, die ggf. nach einem Differenzierungsprozess in der Lage sind, den spezifischen Phänotyp des Gewebes aufrecht zu erhalten oder zu generieren. Die Auswahl geeigneter Zellen ist überaus entscheidend für die Generierung eines Neoknorpels, dessen Eigenschaften denen hyalinen Gelenkknorpels am nächsten kommen sollen [111]. Die ideale Zelle ist einfach und sicher autolog bei geringer Donormorbidität zu isolieren, ist zu starker Expansion fähig und kann kultiviert bzw. differenziert werden, um knorpel-spezifische Proteine stabil zu sezernieren und sezerniert zu stabilisieren. Für Gelenkknorpel sind hierfür Chondrozyten, Fibroblasten, Stammzellen und genetisch modifizierte Zellen auf ihr chondrogenes Potential untersucht worden [111]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des chondrogenen Potentials primärer humaner Chondrozyten und humaner mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks.

1.3.3.1 Primäre humane Chondrozyten

Eine Möglichkeit, chondrogene Gewebskonstrukte *in vitro* zu generieren, ist die Verwendung primärer humaner Chondrozyten (phC) als primäre, native Zellen. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Isolierung aus Knorpelbiopsaten zur Verfügung [78]. Entscheidend für die Verwendung von phC zur Generierung geeigneten Neoknorpels ist es, unter bzw. trotz Generierung hoher Zellzahlen deren native, differenzierte Charakteristiken zu bewahren oder wiederzuerlangen [111].

Monolayer-Expansion isolierter phC *in vitro* verursacht allerdings durch den Verlust der dreidimensionalen Einbettung in der EZM innerhalb weniger Passagen Einbußen des chondrogenen Phänotyps und damit die Dedifferenzierung der Chondrozyten [122], die mit Seneszenz der Zellen, vermehrter Expression unspezifischer Matrixproteine wie Kollagen Typ I, veränderter Expression weiterer Kollagene, Integrine, Wachstumsfaktoren und Matrixmodulatoren sowie Aktivierung von Signalproteinen wie SHC und Erk 1/2 einhergeht [111,123-126]. Diese bereits ab der ersten Passage festzustellende Dedifferenzierung in Monolayer-Kultur lässt sich durch Verwendung geeigneter Substrate, die Applikation von Wachstumsfaktoren

oder die Ko-Kultivierung passagierter mit primären Chondrozyten vermindern [127-130]. *In vitro* sind in Monolayer-Kultur dedifferenzierte Chondrozyten in frühen Passagen in der Lage, unter geeigneten Kulturbedingungen zu redifferenzieren [131,132], ein Prozess, der durch Applikation geeigneter Wachstumsfaktoren wie IGF-1, FGF-2 und TGF- β verstärkt werden kann [133,134]. Auch nach Anfertigen von Pelletkulturen (1.3.3.2, Abb. 5) durch Sedimentieren der pHc konnte die Bildung einer kartilaginären Matrix nachgewiesen werden [135]. Weitere Methoden zur Redifferenzierung sind neben der Anwendung anderer dreidimensionaler, leitschiene freier Kulturformen (1.3.5) der Einsatz geeigneter Leitschienen (Scaffolds, 1.3.4), Bioreaktoren oder ein verminderter O₂-Gehalt der an die Kultur angrenzenden Atmosphäre [136]. Der Einsatz passagierter Chondrozyten führt allerdings insgesamt zu biochemisch und mechanisch eingeschränkter Gewebsqualität [137].

Entscheidende klinische Nachteile und Limitationen der klinischen Verwendung der reifen, primären Gewebezellen sind also neben der Invasivität der Knorpelgewinnung (Donormorbidität im zukünftigen Therapiegebiet, eingriffsspezifische Risiken) die mangelnde Verfügbarkeit ausreichender Zellzahlen aus den Knorpelbiopsaten aufgrund der kartilaginären Hypozellularität, die eine Expansion *in vitro* erforderlich macht und so mit Dedifferenzierung der Zellen einhergeht. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass sich sowohl aus Knorpel aus vorgeschädigten Gelenken als auch aus Gelenkknorpel älterer Patienten isolierte Zellen bereits in einem morbiden Zustand befinden, so dass die Generierung von Neoknorpel unmöglich werden kann [111,126]. Alternativ könnten zur Regeneration von Gelenkknorpel Chondrozyten des Ohrknorpels [138] oder des Nasenseptums [139] herangezogen werden, um die gelenksseitige Morbidität zu reduzieren.

1.3.3.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und deren chondrogene Differenzierung *in vitro*

Ein innovativer Ansatz zur Lösung dieser Nachteile und Probleme stellt die Verwendung einer alternativen Zellquelle dar, die der natürlichen Progenitorzellen (1.2). Sie bieten als adulte pluripotente Stammzellen die Vorteile einer hohen Proliferationskapazität, der Möglichkeit der Differenzierung *in vitro* sowie der geringen ethischen Problematik im Gegensatz zur Anwendung embryonaler Stammzellen. Viele Antigene wie CD34, CD38, CD45, CD80, CD40 und CD40L sowie HLA-DR (MHC-II), die in immunologische Signaltransduktionen eingebunden sind, werden nicht exprimiert, was eine allogene Transplantation möglich erscheinen lässt [140-143]. Im einzelnen sind hMSC bereits klinisch zur Anwendung gekommen [144,145].

Der wesentliche Ansatz der Verwendung mesenchymaler Stammzellen zur Generierung chondrogener Gewebstrukturen basiert auf der chondrogenen *In-vitro*-Differenzierung. Die zentrale Idee hierbei ist die dreidimensionale Aggregation der Zellen im Sinne einer Nachahmung der Kondensationsphase der Chondrogenese unter Applikation chondroinduktiver Wachstumsfaktoren.

Das Standard-Modell für diese chondrogene Differenzierung *in vitro* stellt das System der Pelletkultur dar [146,147]. Durch Sedimentation aggregierte hMSC werden unter Ausbildung intensiver Zell-Zell-Kontakte unter Zugabe geeigneter Wachstumsfaktoren und Medienzusätzen chondrogen differenziert (Abb. 5).



Abb. 5 Pelletkultur: Etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen werden in Suspension in einem konisch zulaufenden 15-ml-Zentrifugenröhrchen (16,5 mm x 1200 mm) aus Polypropylene zentrifugiert. Nach 24–48 Stunden formt sich ein frei flottierendes Zellpellet.

Als chondroinduktive Wachstumsfaktoren kommen Isoformen der TGF- β -Superfamilie (v.a. TGF- β_{1-3} und BMP-2, -6, -9, Growth and Differentiation Factor 5 (GDF-5), Aktivin), IGF-1 und FGF-2 zum Einsatz. TGF- β hat während der *In-vivo*-Chondrogenese (1.1.2) entscheidende Funktion bei der chondrogenen Induktion während der Kondensationsphase [9]. TGF- β -Isoformen zeigen auch *in vitro* starke chondrogene Eigenschaften, unabhängig von Kultursystem und Leitschiene, wobei TGF- β_3 *in vitro* die höchste Potenz aufweist [148]. IGF-1 wirkt ebenfalls anabol und steigert die Proliferation sowie Matrixproduktion in Kombination mit TGF- β [149,150]. FGF-2 zeichnet sich durch seine Mitogenität aus, steigert so die Zellproliferation und erhöht das chondrogene Potential im Rahmen der Monolayer-Expansion [151]. Auch die Kombination von Wachstumsfaktoren samt deren Zyklisierung beeinflusst das Differenzierungsverhalten [149,152]. Die adenovirale Transfektion mit Isoformen des TGF- β oder des BMP sowie des GDF-5 induziert ebenfalls die chondrogene Differenzierung [98,111,153]. Als weitere Zytokine bzw. Hormone sind Aktivin, Osteogenic protein-1, Prolaktin, Interleukin-1 β , Cyr61, HB-GAM und das Wachstumshormon zu nennen [154]. TGF- β und BMP induzieren Smad-regulierte und MAPK-gesteuerte (p38, JNK, ERK) intrazelluläre Signalkaskaden [155]. Letztere stimuliert den essentiellen Transkriptionsfaktor SOX9 (1.1.2).

Neben diesen Wachstumsfaktoren haben sich andere lösliche Faktoren wie Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Insulin, Prostaglandin E2, Schilddrüsenhormon, Ascorbinsäure und Steroide (Dexamethason) sowie mechanische Stimulation (hydrostatischer Druck, dynamische Kompression, Bioreaktoren), Hypoxie [68,156,157] und elektromagnetische Felder als chondroinduktiv erwiesen [111,154,158-161]. Als positive Expressionsmarker chondrogen differenzierter hMSC

gelten die Gene des Kollagens Typ II und IX, Aggrecan, Biglykan, Decorin und COMPs sowie die Transkriptionsfaktoren SOX9 und Scleraxis [98,111].

1.3.4 Leitschienen (Scaffolds)

Zahlreiche Leitschienen verschiedenen Materials kamen im Laufe der letzten Jahre im Bereich des Knorpel-Tissue-Engineerings zur Anwendung. Allgemeine Anforderungen an das Leitschienenmaterial sind strukturelle und mechanische Stabilität, Biokompatibilität und Nicht-Toxizität, das Begünstigen von Zellproliferation, Differenzierung und Matrixsynthese, die Gewährleistung der Diffusion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, geeignete Größe, adäquate Knorpeladhäsion und -integration im Zuge der Implantation sowie die geordnete und kontrollierte Degradation der Leitschiene [111,162,163]. Leitschienen stellen für Zellen eine dreidimensionale Umgebung zur Verfügung, die zum Erhalt oder Erreichen eines chondrogenen Differenzierungsstatus erforderlich ist.

Als Leitschienen wurden natürliche und synthetische polymere Hydrogele, Schwämme und Netze verwendet. Natürliche Polymere sind Alginat, Agarose, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagen, Gelatine, Chitosan, Chondroitinsulfat und Zellulose [111,164]. Mit ihnen können Zellen oft über Rezeptoren interagieren und so Zellfunktionen reguliert werden [111]. Dies könnte allerdings Immunreaktionen provozieren. Für Alginat wurde beispielsweise eine Erhöhung der Lymphozytenaktivität und die Induktion gegen Alginat gerichteter Antikörper beschrieben [165,166]. Weitere Probleme sind mechanische Instabilität aufgrund variabler Degradation durch Empfängerenzyme sowie Schrumpfung *in vivo* [111]. Zu geringe Degradation kann zur Verminderung der EZM-Produktion führen, während zu rascher Abbau der Leitschiene strukturelle Instabilität und Formverlust zur Folge haben kann [111,167]. Unter synthetischen Polymeren wurden Poly- α -Hydroxy-Ester, Polyethylenglykol/-oxid, Poly(NiPAAm), Polypropylenfumarat, Polyvinyl und Polyurethan verwendet [111,164]. Sie zeigen allerdings Nachteile durch Fehlen einer Zell-Leitschienen-Interaktion, die zu Problemen bei der Adhäsion der Zellen und damit der Zelldistribution, der Steuerung der Zellfunktionen, der kontrollierten Degradation der Matrix und deren Remodeling führen kann. Im Zuge der Degradation kann es zur Freisetzung saurer Abfallprodukte kommen, die wiederum inflammatorische Reaktionen verursachen können [162]. Auch hier kann die EZM-Produktion inhibiert sein. Weitere Nachteile sowohl natürlicher als auch synthetischer Leitschienen sind die potentielle Zytotoxizität, Fremdkörperreaktionen, ungleichmäßige Zellverteilung, Chondrolyse, inkomplette Integration und die Schwierigkeit, unregelmäßige Knorpeldefekte mit präfabrizierten Leitschienen zu versorgen sowie zuletzt der hohe Aufwand der Fabrikation und die damit verbundenen Kosten [111,164,166]. Bezüglich der Probleme der Zelldistribution kann eine zonale Zellverteilung nur durch aufwendige Verfahren wie Photopolymerisation multipler Schichten erreicht werden [168].

Auch wenn es zahlreiche vielversprechende Ansätze der Verwendung von Leitschienen zur Regeneration von Gelenkknorpel gibt, konnten bisher keine

zuverlässig stabilen Langzeitergebnisse erreicht werden [169]. Ein Lösungsansatz stellt dabei die Generierung leitschienenfreien Neoknorpels dar.

1.3.5 Leitschienenfreie Ansätze

Leitschienenfreie Ansätze zur Herstellung kartilaginöser Gewebskonstrukte stellen einen möglichen Lösungsansatz der Probleme der Verwendung von Leitschienen dar [169-172]. Anforderungen an ein neues, ideales leitschienenfreies Kultursystem sind, dass es die *In-vivo*-Bedingungen der initialen Schritte der Chondrogenese zur Verfügung zu stellen im Stande ist. Diese Bedingungen erlauben im Zuge einer effektiven Chondrogenese im Idealfall die Synthese und Aggregation der EZM. Zu diesen Voraussetzungen gehören die in 1.1.2 dargestellte hohe initiale Zelldichte während der Kondensationsphase unter Ausbildung intensiver Zell-Zell-Kontakte, die Zell-Matrix-Adhäsion, die parakrine Wirkung von Wachstumsfaktoren, hypoxische Bedingungen und die Nutrition per diffusionem bei adäquater Medium-Zell-Ratio [166,173]. Insbesondere hohe initiale Zelldichten führen bei der chondrogenen Differenzierung in anderen *In-vitro*-Modellen zu vermehrter Matrix-Produktion [174,175]. Eine verstärkte Chondrogenese kann ferner durch Verwendung einer elastischen Zellunterlage erreicht werden und wird durch das Ausmaß der Matrixsteifigkeit und Zelladhäsion reguliert [176,177]. Hierdurch könnten sich Vorteile einer Membran-basierten Kultur gegenüber flottierenden Kulturen wie der Pelletkultur ergeben [172,178].

1.3.6 Leitschienenfreie Membrankultur

Diese Anforderungen könnten durch eine leitschienenfreie Membrankultur erfüllt werden. Bereits in den 1950er Jahren waren sog. „Organoid-Kulturen“ entwickelt worden, um kleinere Gewebstücke von 1–2 mm³ Größe *in vitro* kultivieren zu können [179,180] (Abb. 6). Das Prinzip beinhaltete die Kultivierung von Gewebe an der Oberfläche flüssigen Nährmediums, also am Luft-Medium-Interface, um ausreichend Kontakt mit der vorherrschenden Gasphase herzustellen. Das Kulturmodell diente Untersuchungen der Zelldifferenzierung parenchymatöser Organe und deren Störungen im Sinne eines Teratogenese-Modells [173]. Über die Jahre hinweg wurde es modifiziert und für die Kultivierung von embryonalen Zellen der Maus, Fibroblasten, Chondrozyten und Tenozyten in einem Petrischalenmodell vereinfacht [132,181,182] (Abb. 6). In Monolayer-Kultur dedifferenzierte Chondrozyten konnten in dieser modifizierten Kulturform redifferenziert werden, so dass sich eine potentielle Chondrogenität erahnen lässt [132].

Die Kultur bietet die Möglichkeit eines leitschienenfreien Ansatzes für eine effektive Chondrogenese *in vitro*, da sie die entscheidenden Bedingungen hierfür, eine hohe initiale Zelldichte für ein dreidimensionalen Zellverbund, Ernährung durch Diffusion und eine adäquate initiale Pelletgröße auf einem Filter aufweist [172,183]. Die Wahl des Zelluloseazetats als Material dieser elastischen Zellunterlage bedeutet ferner

eine niedrige Gasdurchlässigkeit für O_2 , was eine der Chondrogenese zuträglichen niedrigen O_2 -Gehalt insbesondere an der Basis der Membrankultur zur Folge hat [184]. Weitere potentiell chondroinduktive Eigenschaften sind in 4.3 diskutiert.

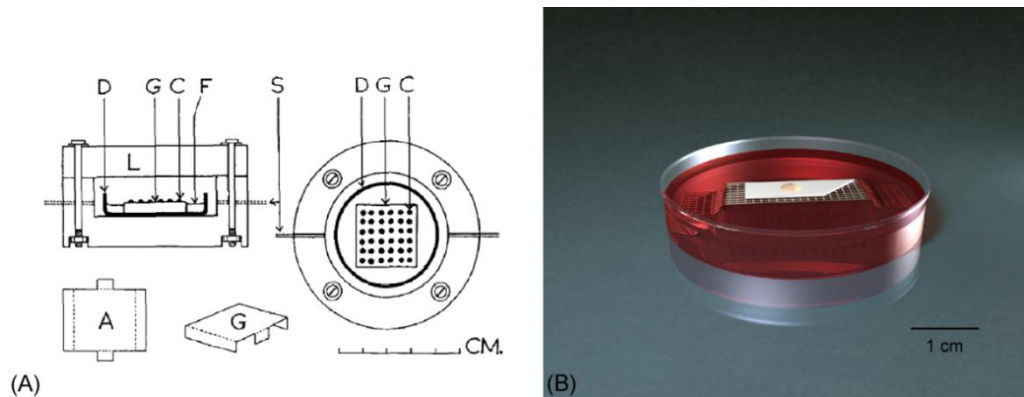


Abb. 6 Diffusionskulturen: (A) Von Trowell entwickelte Organoidkultur. (B) In der vorliegenden Arbeit nach (A) modifizierte Membrankultur. Hierbei wurden etwa 10^6 Zellen auf eine Zelluloseazetatmembran pipettiert, welche sich auf einem Stahlbrückchen platziert in einer mit Medium gefüllten Petrischale im Bereich der Grenzfläche zwischen Medium und Atmosphäre befindet (Luft-Medium-Interface). Die Zellen formen ein Zellpellet, welches per diffusionem ernährt wird.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das chondrogene Potential primärer humaner Chondrozyten (pHC) und humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) des Knochenmarks in einer leitschienenfreien Membrankultur und einer Pelletkultur zu prüfen, um Voraussetzungen für die Herstellung *in vitro* generierten Neoknorpels für die Implantation im Rahmen zellbasierter Therapiestrategien fokaler Knorpeldefekte zu verbessern. Im Zuge dieser Untersuchungen stellten sich folgende Aufgaben:

1. Die Isolierung primärer humaner Chondrozyten aus adultem Gelenknorpel war zu etablieren.
2. Zum Beweis der Multipotenz der verwendeten hMSC waren diese *in vitro* osteogen, adipogen und chondrogen zu differenzieren.
3. Die leitschienenfreie Membrankultur war zu etablieren.
4. In der leitschienenfreien Membrankultur waren pHC zu kultivieren und hMSC chondrogen zu differenzieren.
5. In der Pelletkultur waren als Kontrolle im Sinne des Goldstandards pHC zu kultivieren und hMSC chondrogen zu differenzieren.
6. Im Zuge der chondrogenen Differenzierung waren verschiedene Kombinationen der zur Differenzierung der hMSC verwendeten Wachstumsfaktoren zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Alle experimentellen Arbeiten wurden im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.1 Material

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders ausgezeichnet, im Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet. Lösungen wurden, sofern nicht anders ausgezeichnet, mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

2.1.1 Laborgeräte

Analysewaage	Sartorius, D
Autoklav	H+P Labortechnik, D
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)	Binder, D
Edelstahlbrücken-Matritze, Aluminium	Eigenherstellung
Elektrische Pipettierhilfe, accu-jet pro	Brand, D
Elektrophoresekammer Horizon 11.14	Whatman, D
Elektrophoresenetzgerät PS 304	Whatman, D
Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät FLUOStar Optima	BMG Labtech, USA
Gefrierschrank - 80 °C Herafreeze	Heraeus, D
Gefrierschränke - 20 °C	Bosch, D Liebherr, CH
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, D
Kamerasystem Axio Cam MRc 5	Zeiss, D
Kryo-Thermogefäß	Thermo Scientific, D
Kryotom CM 3050	Leica, D
Kryotommesser	Jung, D
Kühlschränke + 4 °C	Liebherr, CH
Laborschüttler MTS4	IKA Labortechnik, D
Light Cycler® 2.0	Roche Diagnostics, D
Magnetrührer Variomag Monotherm	H+P Labortechnik, D
Mehrkanalpipette 20–200 µl	Brand, D
Mikro-Dismembrator S	Sartorius, D
Mikroskop Objektträger Axioskop 40	Zeiss, D
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40 CFL	Zeiss, D

Molekulares Bildgerät Fluor-S™ Multilmager	Bio-Rad Laboratories, D
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht Assistent, D
pH-Meter HI 122	Hanna Instruments, D
Photometer RNA/DNA Calc. Gene Quant II	Bio-Rad Laboratories, D
Pipettierhilfe elektrisch, accu-jetR pro	Brand, D
Pipettierhilfe Pipetman Neo, 0,2–2 µl, 1–10 µl, 2–20 µl, 20–100 µl, 50–200 µl, 100–1000 µl	Gilson, USA
Reinraumwerkbank, HeraSafe	Heraeus, D
Stickstofftank	Cryotherm, D
Thermo-Cycler DNAEngine	Bio-Rad Laboratories, D
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, D
Wärme- und Heizplatte	Medax, D
Wasserbad	Heraeus, D
Zentrifuge DNA/RNA-Arbeitsplatz 5417R	Eppendorf, D
Zentrifuge Zellkultur Multifuge 1 L-R	Heraeus, D
Zentrifugenadapter Light Cycler®	Roche Diagnostics, D
Trockenschrank	Memmert, D

2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien

Abdecktücher, steril, Secu-Drape	Sengewald, D
Aceton	Merck, D
Alu-Laborfolie, weich, glatt, 0,030 x 300 mm, 0,013 x 300 mm	Schubert & Weiss, Omnilab, D
Ameisensäure	Merck, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, D
Bacillol AF	Bode Chemie, D
Bechergläser	Schott Duran, D
Chloroform	Sigma-Aldrich, D
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, D
Einwegpinzetten, steril, 12,5 cm, anatomische Form	Heinz Herenz Medizinalbedarf, D
Einwegskalpelle, steril, Größe 11, 15	Feather Safety Razor, J
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, D
Erlenmeyer Kolben	Schott Duran, D
Essigsäure 100 %	VWR, D
Ethanol 40 %, 70 %, 96 %, 100 % je in aqua dest.	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D

Ethanol absolut zur Synthese	Merck VWR, D
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, D
Formaldehyd Lsg. 4 %	Fischar, D
Formalin	Merck, D
Gesichtsmasken	Mölnlycke Health Care, SE
Gigasept R AF	Schülke & Mayr, D
Isopropanol	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Laborhandschuhe puderfrei, Größe L	Lohman & Rauscher, AT
Magnesiumchlorid	Honeywell Specialty Chemicals Seelze, D
Natriumacetat	Merck, D
Natriumchlorid	Merck, D
Natriumformiat	Merck, D
Natriumhydroxid	Merck, D
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Pinzetten	Carl Roth, D
Pipettenspitzen 5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, USA
Pyrogallussäure	Merck, D
Salzsäure	Merck, D
Scheren	Carl Roth, D
Silbernitrat	Merck, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, D
Wägebapier 10 x 13 cm	Neolab, D
Xylol	Merck, D
Zitronensäure	Merck, D
Untersuchungshandschuhe Nitril, puderfrei	Semper, D

2.1.3 Zellkultur

Amphotericin B Lsg. 250 µg/ml	Sigma-Aldrich, D
L-Ascorbat	Sigma-Aldrich, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, D
Dexamethason 64,5 mg/g	Sigma-Aldrich, D
DMEM	Biochrom, D

DMEM/Ham's F12	Biochrom, D
DMSO	Merck, D
Endoproteinase K aus <i>Engyodontium album</i>	Sigma-Aldrich, D
FBS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, AT
Glycerol-2-phosphat-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, D
IBMX	Sigma-Aldrich, D
Imidazol	Fluka, CH
Indomethacin	Sigma-Aldrich, D
Insulin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, D
ITS+ Premix 1000 mg/l Insulin, 550 mg/l Transferrin, 500 µg/l Selen, 50 mg/ml BSA, 470 µg/ml Linolsäure	Sigma-Aldrich, D
Kollagenase Iα1	Sigma-Aldrich, D
Kryoröhrchen 1,8 ml SI	Nunc, DK
L-Ascorbat-2-phosphat	Sigma-Aldrich, D
L-Glutamin	Biochrom, D
L-Prolin	Sigma-Aldrich, D
MEM-Aminosäuren	Biochrom, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, D
Oberflächenspray Mycoplasma-Off	Minerva-Biolabs, D
PBS-Puffer Zellkultur, pH 7,4	Biochrom, D
Penicillin/Streptomycin 10000 IU/ml / 10000 µg/ml	Biochrom, D
Petrischalen, steril, Nunclon™ Polystyrene 8,8 cm ² , 56,7 cm ²	Nunc, DK
Pronase aus <i>Streptomyces griseus</i>	Roche, D
Rekombinanter FGF-2	PeptoTech, D
Rekombinanter IGF-1	PeptoTech, D
Rekombinanter TGF-β ₃	R&D Systems, USA
Serumpipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar Corning, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, D
Edelstahlnetz 1.4401 (V4A) Maschenweite 0,63 mm, Drahtdicke 0,22 mm	Drahtweberei Gräfenthal, D
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S: 0,2 µm, Zelluloseazetat	Whatman Schleicher & Schuell, D
Trypanblau 0,4 %	Gibco Invitrogen, D
Trypsin/EDTA Lsg. 10x, 0,5 %; 0,2 %	Biochrom, D
Zellfilter 100 µm steril	BD Biosciences, B
Zellkulturflaschen Nunclon™ Polystyrene 6-well, 25 cm ² , 80 cm ² , 175 cm ² , 500 cm ²	Nunc, DK
Zelluloseazetat-Filter 0,2 µm,	Sartorius, D

Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, CH
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Beckton Dickson Labware, F
Zusatz Wasserbad Aqua stabil	Julabo Labortechnik, D
α MEM	Biochrom, D

2.1.4 Histologie und Immunhistologie

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, D
Aquatex	Merck, D
Biopsie-Blockformen Cryomold 10 mm x 10 mm x 5 mm	Sakura Finetec Europe, NL
Chondroitinase ABC aus <i>Proteus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich, D
Deckgläser	Menzel, D
DPX	Sigma-Aldrich, D
Fast Green	Waldeck, D
Eukitt	O. Kindler, D
Faltenfilter qualitativ 185 mm	Roth, D
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, D
Kernechtrot	Sigma-Aldrich, D
Objekträger SuperFrost Plus	Menzel, D
Ölrot O-0265	Sigma-Aldrich, D
Peroxidase Substrat Kit DAB SK-4100	Vector Laboratories, USA
Safranin-T	Fluka, CH
Sucrose >99,5 %	Merck, D
Tissue-Tek	Sakura Finetec Europe, NL
Toluidinblau 1B481	Waldeck, D
Tween 20	Merck, D
Vectasin ABC Kit	Vector Laboratories, USA
Normalserum der Ziege	Vector Laboratories, USA
Sekundärantikörper biotinyliert, Anti-Maus aus der Ziege	Vector Laboratories, USA
May-Grünwald-Lösung	Roth, D
Saure Hämalaunlösung (nach P. Mayer) Romeis § 648	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D

Primärantikörper

Monoklonal IgG 2a, Kollagen Typ II ClIC1, Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
--	---

Monoklonal IgG 1, Kollagen Typ I, Maus	Sigma-Aldrich, D
--	------------------

2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, D
6x Loading Dye Lsg.	Fermentas, D
Agarose	Invitrogen, D
DNA-Leiter GeneRuler 100 bp	Fermentas, D
dNTP Set	Fermentas, D
Ethidiumbromid Lsg. 10 mg/ml	BioRad Laboratories, D
Light Cycler® FastStart DNA Master _{PLUS}	Roche Diagnostics, D
Light Cycler® Kapillaren 20 µl	Roche Diagnostics, D
Light Cycler® Primer Set	Search LC, D
RNase Inaktivierungsspray	Ambion, D
RNase-freie Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, D
RNase-freie Pipettenspitzen	Kisker, D
RNase-freies Aqua destillata	Ambion, D
Kit für Reverse Transkription qualitative PCR	Promega, USA
Set für Reverse Transkription quantitative PCR Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Sciences, D
Set für RNA-Isolierung Gewebskonstrukte und Fettgewebe RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Quiagen, D
Set für RNA-Isolierung Monolayer RNeasy Mini Kit	Quiagen, D
SYBR Green I	Roche Diagnostics, D
TAE Puffer 10 x	Invitrogen, D
Taq Polymerase mit Puffer	Fermentas, D
PCR-Reaktionsgefäße	Kisker, D
RNase-Free DNase Set	Quiagen, D

Primer der qualitativen PCR

Sämtliche Primer für die qualitative PCR wurden bei Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland, erworben.

Humanes Gen	Primersequenz	Referenz	Amplifikat	Annealing
COL1- α 2-F COL1- α 2-R	5'-CTGGACCCAAAGGCCCCACT-3' 5'-CCTTGCCTCCAGGTATGCCA-3'	Humane Genombank	480 bp	65 °C 60 °C
Osteokalzin-F Osteokalzin-R	5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3' 5'-CGTAGAAGCGCCGATAGGC-3'	[185]	292 bp	63 °C 62 °C
Leptin-F	5'-ATGCATTGGGAACCCCTGTGC-3'	[185]	500 bp	55 °C 70 °C

Leptin-R	5'-GCACCCAGGGCTGAGGTCCA-3'			
PPAR γ 2-F	5'-CTCCTATTGACCCAGAAAGC-3'	[185]	347 bp	58 °C
PPAR γ 2-R	5'-GTAGAGCTGAGTCTTCTCAG-3'			58 °C
GAPDH-F	5'-CACTGACACGTTGGCAGTGG-3'	[185]	416 bp	63 °C
GAPDH-R	5'-CATGGAGAAGGCTGGGGCTC-3'			65 °C

Tab. 2 Untersuchte humane Gene, Sequenzen und Kennzahlen der für die konventionelle PCR verwendeten Primer.

Primer der quantitativen PCR

Sämtliche Primer für die quantitative PCR wurden bei Search LC, Heidelberg, Deutschland, erworben. Bei Search LC sind keine Informationen über die Primer-Sequenzen zu beziehen.

Humanes Gen	LOT
Cyclophilin B	281107
Kollagen Typ II α 1	280807
Kollagen Typ X α 1	280207
Aggrekan	140408
COMP	251006
SOX9	130207

2.1.6 Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane

96-Well Fluoreszenz-Mikroplatten UV-Star, F-Boden, μ -clear	Greiner Bio-one, D
Proteinase K aus <i>Engyodontium album</i>	Sigma-Aldrich, D
Chondroitin-6-sulfat-Na-Salz aus Hai-Knorpel	Sigma-Aldrich, D
1,9-Dimethyl-Methylen-Blau	Sigma-Aldrich, D
DNA aus Kalbsthymus	Sigma-Aldrich, D
Hoechst Fluoreszenzfarbstoff 33258	Sigma-Aldrich, D
Ameisensäure 98-100 % reinst DAC	Merck VWR, D
Natriumformiat zur Analyse ACS	Merck VWR, D
QuantiFluo DNA Assay Kit	Bioassay Systems, USA

2.1.7 Software

Adobe Photoshop CS
Adobe Reader, V 9
AxioVision, Rel. 4.5

Cycler Software, V 3.5
Optima Software, V2.20
IrfanView, V 2.47
Mircrosoft Office Professional 2010
Photo Brush, V 4.1
Prism, V 3.0
Reference Manager, V 11
Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software, V 3.5
Zoner Draw, V 4
Cinema 4D, V 11.5
Multianalyst, V 1.1

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultivierung

Räumliche und apparative Voraussetzungen für Zell- und Gewebekultur sowie Steriltechniken entsprachen hohen labortechnischen Standards [184]. Arbeiten der Zell- und Gewebekultur wurden unter einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Kulturmedien und deren Zusätze wurden kurz vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Inkubation der Zellen und Gewebe erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre in Raumluft sowie 95% Luftfeuchtigkeit. Zellsuspensionen wurden, soweit nicht anders ausgezeichnet, bei 450 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert.

Reinigung und Sterilisation

Zur Herstellung reiner und steriler Bedingungen für Arbeiten der Zellkultur wurden folgende Anwendungen durchgeführt: Nicht-hitzeempfindliche Geräte und Materialien wurden im Autoklaven bei 120 °C feuchter Hitze für 20 min und bei 0,3 bar Überdruck sterilisiert. Der Brutschrank wurde durch ein präinstalliertes Sterilisationsprogramm Heißluft-sterilisiert (4 h bei 200 °C). Das Wasserbad wurde zur Desinfektion mit dem Wasserbad-Schutzmittel „Aqua stabil“ versetzt. Arbeitsoberflächen und Einweghandschuhe wurden vor Aufnahme der Arbeit mit Ethanol (70%) und in regelmäßigen Abständen mit „Mycoplasma-Off“ behandelt. Zur Zellkultur verwendete hitzeempfindliche Flüssigkeiten wurden über Sterilfilter 0,2 µm Porengröße steril filtriert.

Lichtmikroskopie

Zur Kontrolle während der Zellexpansion und -differenzierung in Monolayer wurden die Zellkulturflaschen im inversen Lichtmikroskop evaluiert und dies elektronisch fotodokumentiert.

Medienherstellung

Die Herstellung gebrauchsfertiger Zellkulturmedien erfolgte nach Standard [184]. Basalmedium und Medienzusätze wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und anschließend die Medienzusätze und Teillösungen unter der Sterilwerkbank in die Mediengrundlösung pipettiert. Nicht steril hergestellte Lösungen wurden zuvor steril filtriert (s. 2.2.1.1.1).

Auftauen der Zellen

In flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C gelagerte Kryoröhrchen kryokonservierter Zellen wurden für wenige Sekunden unter der Reinraumwerkbank geöffnet und anschließend in das Wasserbad (37 °C) verbracht. Unmittelbar nach Verflüssigung des Inhalts wurden die Zellen in 5 ml entsprechenden Kulturmediums aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in frischem Kulturmedium nach Verwerfen des Überstands vorsichtig resuspendiert und gezählt.

Zählen der Zellen

Die Ermittlung der Zellzahl einer Zellsuspension im Rahmen der Aussaat, Passagierung oder Überführung in ein dreidimensionales Kultursystem erfolgte nach Entnahme eines Aliquots und dessen Anfärbung mit Trypanblau im Rahmen des Trypanblau-Ausschlusstests zur Viabilitätstestung [184]. Hierzu wurde der Suspension ein Aliquot von 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau 0,4% in einem Reaktionsgefäß vermischt (1:1). Geschädigte oder tote Zellen nahmen aufgrund der fehlenden Integrität der Zellmembran den Farbstoff in ihr Zytosol auf und wirkten dunkel, während lebende Zellen durch das hochmolekulare, nicht-membrangängige Trypanblau nicht angefärbt wurden und anschließend im Phasenmikroskop hell erschienen [184]. Die angefärbte Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, welche aus neun Quadraten à 1 mm² Fläche und 0,1 mm Tiefe und damit à 0,1 µl Volumen bestand. Zur Zellzahlbestimmung wurden in der Zählkammer die in den Quadraten erscheinenden Zellen gezählt. Die Zellkonzentration der Zellsuspension, aus dem das Aliquot entnommen worden war, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}_{\text{Suspension}}} = \frac{n_{\text{Zellen gesamt}}}{n_{\text{ausgezählte Quadrate}}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Viabilität der Zellsuspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{n_{\text{lebende Zellen}}}{n_{\text{lebende + tote Zellen}}}$$

Aussaat und Kultivierung in Monolayer

Alle Zellen wurden nach Isolierung oder Auftauen aus der Kryokonservierung in Monolayer-Kulturflaschen unter Zugabe des jeweiligen Kulturmediums expandiert, um eine für die folgenden Versuche ausreichende Zellzahl zu generieren. Sämtliche Monolayer-Kultivierungen wurden in Kulturflaschen auf Nunclon™-Flächen vorgenommen. Im Rahmen des jeweiligen Versuchsansatz, der Zellart und der Passage erfolgte dies in Abhängigkeit verschiedener Gesamtzellzahlen und Zelldichten in Monolayer-Zellkulturflaschen unterschiedlicher Kulturfläche nach Empfehlungen des Herstellers (Kulturfläche 25 cm², 80 cm², 500 cm²). Dabei wurde, soweit nicht anders angegeben, das vom Hersteller empfohlene Volumen Nährmedium verwendet. Nach Zählen der Zellen wurden diese mit einer Dichte von 2×10^3 / cm² ausgesät, soweit nicht anders angegeben. Das Kulturmedium wurde am fünften Tag nach Aussaat bei mikroskopisch gesichertem Anwachsen der Zellen sowie ansonsten dreimal wöchentlich gewechselt. Dabei wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, bei 500 cm² Kulturflaschen in spezieller Technik abgegossen, eine Spülung mit PBS-Lösung vorgenommen und anschließend die entsprechende Menge frischen Kulturmediums hinzugefügt. Das Alter der Zellen wurde nach dem Passagieren in Passagen angegeben.

Passagieren der Zellen

Sämtliche Zellen in Monolayer wurden bei einer Konfluenz von etwa 60% bis 80% durch Applikation einer Trypsinlösung abgelöst und entweder in der nächsthöheren Passage in Monolayer kultiviert und somit gesplittet oder in Monolayer differenziert bzw. in dreidimensionale Kultursysteme überführt. Hierzu wurde zunächst das Medium samt den in ihm gelösten Schwebstoffe abgesaugt, die Zellen mehrfach mit PBS-Lösung gewaschen und so Mediumreste entfernt, um eine Inaktivierung der zuzugebenden Trypsinlösung zu verhindern. Anschließend wurden zum Ablösen der Zellen diese mit einfach konzentrierter Trypsin-EDTA-Lösung 0,05% / 0,02% in PBS inkubiert, wobei die Kulturfläche der Zellkulturflaschen vollständig mit Lösung bedeckt wurde. Diese Inkubation wurde für fünf Minuten im Brutschrank vorgenommen und anschließend das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe des serumhaltigen Kulturmediums wurde die Trypsinaktivität weitgehend gestoppt und die erhaltene Zellsuspension daraufhin zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und gezählt.

Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen zur Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C (Langzeitkryokonservierung) oder bei -80 °C (Kurzzeitkryokonservierung) wurden die Zellen trypsiniert, nach dem Stoppen der Reaktion durch Kulturmedium zentrifugiert und in Einfriermedium sorgfältig resuspendiert. Dabei wurden die Zellkonzentrationen zwischen 10^5 und 2×10^6 / ml gewählt und das Gesamtvolumen auf 1,5 ml im Kryoröhrchen angesetzt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Einfriermedien ist

Tab. 2 zu entnehmen. Die Zellsuspension wurde zügig bei -80 °C eingefroren und ggf. am nächsten Tag zur Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Zellen	Kulturmedium [%]	FCS [%]	DMSO [%]
hMSC	hMSC-Kulturmedium 85	5	10
phC	phC-Kulturmedium 70	20	10

Tab. 3 Zusammensetzung der Einfriermedien für hMSC und phC.

2.2.1.2 Dreidimensionale Kultursysteme

Die Kultivierung der phC und chondrogene Differenzierung der hMSC erfolgte in den dreidimensionalen Kultursystemen, der Pellet- und der Membrankultur. Der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls in beiden Kultursystemen dreimal wöchentlich.

2.2.1.2.1 Pelletkultur

Die Pelletkultur wurde nach einem nach Brian Johnstone et al. (1998) modifizierten Protokoll durchgeführt (s. 1.3.3.2, Abb.3). Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren, Resuspendieren in jeweiligem Kulturmedium und Zählen der Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in Suspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml, Polypropylene) überführt und anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml Differenzierungsmedium vorsichtig resuspendiert und bei 150 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Verschlusskappe gelockert, um den Gasaustausch im Brutschrank zu ermöglichen und die Zentrifugenröhrchen in einem entsprechenden Ständer in den Brutschrank verbracht, in dem sie für mindestens 48 h nicht bewegt wurden. Nach 24–48 h formten sich frei flottierende Zellpellets in den Zentrifugenröhrchen.

2.2.1.2.2 Membrankultur

Zur Anfertigung der Membrankultur waren zunächst die erforderlichen Bestandteile herzustellen. Zur Eigenherstellung der erforderlichen Drahtbrückchen wurde zunächst aus Aluminium eine Matritze hergestellt, mit der Brückchen einer Auflagefläche von 20 mm Länge und 4 mm Höhe bei 35 mm Gesamtlänge aus Edelstahlnetz (Edelstahl 1.4401 (V4A)) mit einer Maschenweite von 0,63 mm und einer Drahtdicke von 0,22 mm gefertigt wurden. Die Brückchen wurden anschließend auf eine Breite von 15 mm zurechtgeschnitten. Als weitere Bestandteile wurden Zelluloseazetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm, einer Wasserflussrate von 24 ml/min (DIN 58355), einer Adsorption von $< 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für BSA und einer Dicke von 120 µm (DIN 53105) verwendet. Diese wurden auf ca. 20 mm x 8 mm zugeschnitten, wobei je eine breite Seite angeschrägt abgeschnitten wurde, was der Markierung der jeweils rauen Oberfläche eines Filterfähnchens diente. Zeigte die Spitze des

Filterföhnchens nach rechts oben, so zeigte die raue Seite des Filters nach oben, auf welcher die Zellsuspension aufzubringen war.

Zum Ansetzen der Membrankultur wurde zunächst unter sterilen Bedingungen je ein Stahlbrückchen in eine Petrischale transferiert und anschließend mit 1,8 ml bis 2,2 ml Differenzierungsmedium übergossen, so dass sich der Pegel des Mediums exakt auf der Höhe der Auflagefläche des Stahlbrückchens befand. Anschließend wurde ein Filterföhnchen mit der rauen Seite nach oben gerichtet auf das Stahlbrückchen aufgebracht, wobei darauf zu achten war, dass sich unterhalb des Filters keine die Diffusion beeinträchtigenden Luftblasen befanden. Die Petrischale wurde geschlossen zum Trocknen für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem anschließenden Trypsinieren, Zentrifugieren, Resuspendieren in jeweiligem Kulturmedium und Zählen der Zellen wurden diese in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml, Polypropylene) gepoolt und anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet vorsichtig in 8 ml Differenzierungsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Medium so vollständig wie möglich abpipettiert und das Zellpellet erneut für 1 min bei 450 g zentrifugiert. Nach exaktem Abpipettieren des geringen Überstandes wurde nun mit einer schräg abgeschnittenen Pipettenspitze und einer Pipette 4 μ l Zellpellet entsprechend 1×10^6 Zellen auf das Filterföhnchen pipettiert. Abschließend wurde die Membrankultur in den Brutschrank verbracht.

2.2.1.3 Primäre humane Chondrozyten (phC)

2.2.1.3.1 Zellgewinnung

Primäre humane Chondrozyten (phC) wurden aus humanem hyalinen Gelenkknorpel der Kondylen des Kniegelenks verstorbener kaukasischer Spender im Alter zwischen 22 und 46 Jahren innerhalb 12 h nach Eintritt des Todes im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen [183]. Ein entsprechender Ethikantrag des Instituts für Rechtsmedizin liegt vor. Die Isolierung erfolgte nach der von Shakibaei beschriebenen Methode [186] in modifizierter Technik. Bei allen Spendern war das Vorliegen negativer serologischer Untersuchungen bezüglich HIV und Hepatitis B und C Voraussetzung für die Annahme als Spender. Nach steriler Entnahme von Knorpelschuppen von etwa 3 x 3 cm wurden diese in Transportmedium (DMEM + 150 IU/ml Penicillin / 150 μ g/ml Streptomycin + 0,75 μ g/ml Amphotericin B) aufgenommen und bis zum Eintreffen der serologischen Befunde bei 4 °C zwischengelagert. Anschließend wurden die Knorpelschuppen in Petrischalen überführt und mit Waschmedium (DMEM/Ham's F12 + 50 IU/ml Penicillin / 50 μ g/ml Streptomycin + 0,25 μ g/ml Amphotericin B) mehrfach gespült. Anschließend erfolgte in der Petrischale in Waschmedium die Zerkleinerung der Knorpelschuppen auf möglichst kleine Stücke (circa 2 mm) mit dem Einwegskalpell. Anschließend erfolgte die zweifache Spülung mit PBS-Lösung. Die Knorpelstücke wurden hierauf für 60 min mit 0,5 % Pronase in Waschmedium und anschließend

nach zweifachem Spülen mit PBS-Lösung in 0,1 % Kollagenase Ia1 für 240 min in Waschmedium im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde alsdann mehrfach über ein Zellsieb der Porengröße 100 µm pipettiert, um kleinere Knorpelstücke zu entfernen. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen gezählt. Anschließend wurden sie in einer Dichte von $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ in Passage 0 in Monolayer-Kulturflaschen ausgesät.

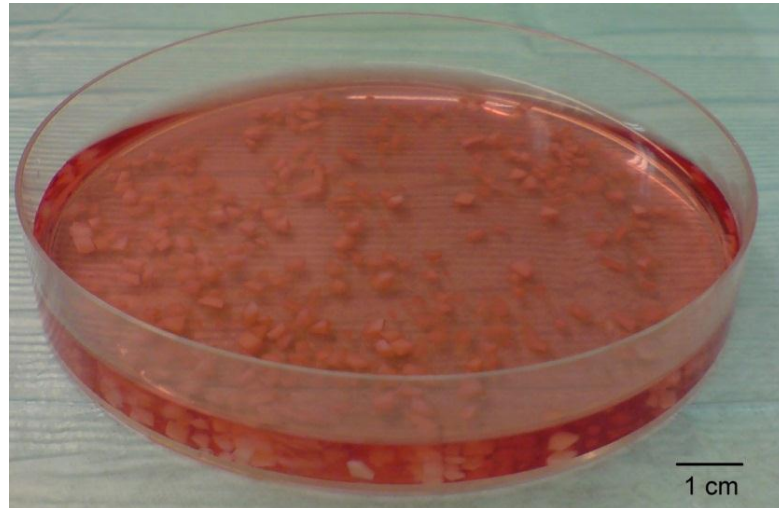


Abb. 7 Knorpelstücke von ca. 2 mm Länge und Breite in Waschmedium wurden unter sterilen Kautelen aus Knorpelschuppen mittels Skalpell gefertigt und anschließend in Pronase und Kollagenase inkubiert (s. 2.2.1.3.1).

2.2.1.3.2 Kulturmedien

Kulturmedium in Monolayer

Die Zusammensetzung des Mediums für die Monolayer-Kultivierung von pHc ist in Tab. 3 zusammengestellt.

Medium(zusätze)	Konzentration im Medium
DMEM/Ham's F12 1:1	
Fetales Kälberserum	10 %
MEM-Aminosäuren	1 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Amphotericin B	0,25 µg/ml

Tab. 4 Zusammensetzung des Kulturmediums für pHc in Monolayer.

Kulturmedium in dreidimensionalen Kultursystemen

Die Zusammensetzung des Mediums für die Kultivierung von pHc in dreidimensionalen Kultursystemen ist in Tab. 4 zusammengestellt. Die Kultivierung erfolgte unter serumfreien Bedingungen, um das chondrogene Potenzial effektiver zu erhalten [187].

Medium(zusätze)	Konzentration im Medium
DMEM high glucose	
Insulin	10 mg/l
Transferrin	5,5 mg/l
Selen	5 µg/l
Bovines Serum Albumin	0,5 mg/ml
Linolsäure	4,7 µg/ml
Dexamethason	0,1 µM
L-Ascorbat-2-Phosphat	0,2 mM
L-Prolin	0,35 mM
Penicillin	30 IU/ml
Streptomycin	30 µg/ml

Tab. 5 Zusammensetzung des Kulturmediums für pHc in dreidimensionalen Kultursystemen.

2.2.1.3.3 Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen

pHc wurden in Monolayer von der Isolierung bis zur 6. Passage kultiviert und während jedes Passagierens sowohl in die nächsthöhere Passage in Monolayer ausgesät als auch jeweils in Pellet- und Membrankultur überführt. In den dreidimensionalen Kulturen wurden pHc für je 7 und 21 Tagen kultiviert. Am Ende jeder Monolayer-Kultivierung erfolgte die Entnahme eines repräsentativen Aliquots zur Isolierung der RNA. Am Ende der Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen erfolgt die Aufbereitung der Zellkonstrukte für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen, die Polymerase-Kettenreaktion und den Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane.

2.2.1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

2.2.1.4.1 Zellgewinnung

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Lonza, USA, bezogen. Die Zellen wurden von einem 19jährigen Schwarzen und einem 25jährigen Kaukasier gespendet. Vortestungen durch Lonza ergaben negative serologische Befunde für HIV, Hepatitis B und C. Unter den verwendeten Zellen wurden 90 % positiv für CD105, CD166, CD29 und CD44 sowie < 10 % positiv für CD14, CD34 und CD45 getestet.

2.2.1.4.2 Kultivierung in Monolayer

Die Kultivierung in Monolayer erfolgte für hMSC, welche für die chondrogene Differenzierung vorgesehen waren, in der Passage unmittelbar vor Überführung in die dreidimensionalen Kultursysteme unter Zugabe von rhFGF-2, um das chondrogene Potential und die Telomerlänge der Zellen zu erhöhen [151,188]. HMSC wurden in der 3. Passage in einer Dichte von $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ ausgesät [188]. Die Passagierung wurde zwischen 60 % und 80 % Konfluenz frühzeitig vorgenommen, um eine Spontandifferenzierung der Zellen zu verhindern. Die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für hMSC ist Tab. 6 zu entnehmen.

Medium(zusätze)	Konzentration im Medium
αMEM	
Fetales Kälberserum	10 %
rhFGF-2	5 ng/ml (nur vor chondrogener Differenzierung)
Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tab. 6 Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für hMSC.

2.2.1.4.3 Osteogene Differenzierung in Monolayer

Die osteogene Differenzierung wurde nach dem Protokoll von Neelam Jaiswal und Kollegen [189] durchgeführt. HMSC der 6. Passage des kaukasischen Spenders wurden verwendet.

Osteogenes Differenzierungsmedium

Die Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums ist Tab. 6 zu entnehmen.

Medium(zusätze)	Konzentration im Medium
DMEM high glucose	
Fetales Kälberserum	10 %
Dexamethason	100 nM
β -Glycerophosphat	10 mM
L-Ascorbat-2-Phosphat	50 μM
Penicillin	40 IU/ml
Streptomycin	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tab. 7 Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.

Versuchsansatz und Differenzierungsprotokoll

Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren in Kulturmedium für hMSC wurden die Zellen gezählt und anschließend in einer Dichte von $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 6-well-Kulturplatten unter Verwendung des Kultivierungsmediums für hMSC ohne rhFGF-2 (s. Tab. 5) gleichmäßig ausgesät. Die Differenzierung begann am zweiten

Tag nach Aussaat der Zellen bei 70 % Konfluenz durch Anwendung des osteogenen Differenzierungsmediums (s. Tab. 6) und wurde 21 Tage durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Die Kultivierung der Kontrollgruppe erfolgte gleich, außer dass als Nährmedium ein Kontrollmedium (DMEM high glucose + 40 IU/ml Penicillin + 40 µg/ml Streptomycin) verwendet wurde. Nach 21 Tagen Differenzierung wurden die Zellen in den 6-well-Platten histochemisch angefärbt oder der RNA-Isolierung für die Polymerase-Kettenreaktion zugeführt.

2.2.1.4.4 Adipogene Differenzierung in Monolayer

Die adipogene Differenzierung wurde nach Mark Pittenger und Kollegen [85,190] durchgeführt. HMSC der 6. Passage des kaukasischen Spenders wurden verwendet.

Adipogene Differenzierungsmedien

Zur adipogenen Differenzierung wurde ein Induktions- und ein Erhaltungsmedium verwendet, deren Zusammensetzung Tab. 7 zu entnehmen ist.

Medium(zusätze)	Konzentration im Induktionsmedium	Konzentration im Erhaltungsmedium
DMEM high glucose		
Fetales Kälberserum	10 %	10 %
3-Isobutyl-1-methylxanthin	1mM	Nicht enthalten
Dexamethason	1 µM	Nicht enthalten
Indomethacin	0,2 mM	Nicht enthalten
Insulin	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml
Penicillin	40 IU/ml	40 IU/ml
Streptomycin	40 µg/ml	40 µg/ml

Tab. 8 Zusammensetzung der adipogenen Differenzierungsmedien.

Versuchsansatz und Differenzierungsprotokoll

Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren in Kulturmedium für hMSC wurden die Zellen gezählt und anschließend in einer Dichte von $10 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 6-well-Kulturplatten unter Verwendung des Kultivierungsmediums für hMSC ohne rhFGF-2 (s. Tab. 5) gleichmäßig ausgesät. Die Differenzierung begann am dritten Tag nach Aussaat der Zellen bei nahezu 100 % Konfluenz durch Anwendung des adipogenen Induktionsmediums (s. Tab. 7). Insgesamt wurde die adipogene Differenzierung 21 Tage durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, wobei jeweils vier Tage Induktionsmedium und jeweils drei Tage Erhaltungsmedium appliziert wurde. Die Kultivierung der Kontrollgruppe erfolgte auf gleiche Weise, außer dass als Nährmedium ein einheitliches Kontrollmedium (DMEM high glucose + 40 IU/ml Penicillin + 40 µg/ml Streptomycin) verwendet wurde. Nach

21 Tagen Differenzierung wurden die Zellen in den 6-well-Platten histochemisch angefärbt oder der RNA-Isolierung für die Polymerase-Kettenreaktion zugeführt.

2.2.1.4.5 Chondrogene Differenzierung in dreidimensionalen Kultursystemen

Die chondrogene Differenzierung wurde nach einer Methode in Anlehnung an Brian Johnstone und Kollegen (1998) durchgeführt. HMSC der 5. Passage des schwarzen Spenders wurden verwendet.

Chondrogenes Differenzierungsmedium und Wachstumsfaktoren

Das Differenzierungsmedium für die chondrogene Differenzierung der hMSC in Pellet- und Membrankultur entsprach dem Kultivierungsmedium für pH3 in dreidimensionalen Kultursystemen (Tab. 5), wobei ersterem die in 2.2.1.4.5.2 aufgeführte Kombinationen aus Wachstumsfaktoren hinzugefügt wurden. Verwendete Wachstumsfaktoren waren rhTGF- β_3 , rhIGF-1 und rhFGF-2. Diese wurden bei jedem Wechsel des Mediums diesem frisch zugeführt.

Versuchsansatz und Differenzierungsprotokoll

Die chondrogene Differenzierung der hMSC wurde ausschließlich in den dreidimensionalen Kultursystemen Pellet- und Membrankultur durchgeführt. Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren in Kulturmedium für hMSC wurden die Zellen gezählt und anschließend wie in 2.2.1.2.1 und 2.2.1.2.2 beschrieben in die dreidimensionalen Kultursysteme unter Applikation des Differenzierungsmediums für die chondrogene Differenzierung unter Zugabe verschiedener Kombinationen aus Wachstumsfaktoren überführt. Aus diesen Kombinationen ergaben sich sowohl für Pellet- als auch Membrankultur je vier Differenzierungsgruppen:

1. 10 ng/ml rhTGF- β_3 + 100 ng/ml rhIGF-1 (G1)
2. 10 ng/ml rhTGF- β_3 + 5 ng/ml rhFGF-2 (G2)
3. 10 ng/ml rhTGF- β_3 (G3)
4. Kein Zusatz von Wachstumsfaktoren (Kontrollgruppe) (G4)

Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Die Differenzierung wurde für 21 Tage durchgeführt. Anschließend wurden die entstandenen Gewebstrukturen für histochemische und immunhistochemische Untersuchungen, die Polymerase-Kettenreaktion und den Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane weiterverarbeitet.

2.2.2 Histologie und Immunhistologie

2.2.2.1 Einbettung der Gewebstrukturen aus dreidimensionalen Kultursystemen

Gewebstrukturen aus der Pelletkultur wurden nach Absaugen des Mediums mehrfach mit PBS-Lösung gespült, anschließend vorsichtig in PBS-Lösung unter

Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze ($10^3 \mu\text{l}$) in Biopsie-Blockformen (Cryomold-Formen) pipettiert und hier nochmals vorsichtig mit PBS-Lösung gespült. Das Vorgehen bei Gewebskonstrukten aus der Membrankultur verlief analog, wobei diese samt Zelluloseazetatmembran mit einer Einwegpinzette in die Cryomoldformen überführt wurden.

Nach Inkubation der Gewebskonstrukte in PBS-Lösung mit 5% Sucrose für 30 min bei $+ 4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde diese sorgfältig abpipettiert und die Cryomoldformen mit Tissue-Tek gefüllt. Diese wurden hiernach in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.2.2 Anfertigung und Fixierung der Schnittpräparate

Von den in Tissue Tek gefrorenen Gewebskonstrukten aus der chondrogenen Differenzierung wurden im Gefriermikrotom $10 \mu\text{m}$ dicke Kryo-Schnitt-Präparate angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Gefrierschnitte wurden für 60 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, anschließend mit gekühltem Aceton fixiert und ggf. nach Verpackung in Alu-Laborfolie bei $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor Beginn der Färbungen wurden die Kryoschnitte bei Raumtemperatur 15 min aufgetaut und anschließend rehydriert.

2.2.2.3 Histologie und Histochemie

Von-Kossa-Färbung

Zellen nach osteogener Differenzierung und deren Kontrollgruppe wurden mit der Von-Kossa-Färbung bezüglich der intra- und extrazellulären Mineralisation evaluiert. Durch das applizierte Silbernitrat kommt es zu einer Präzipitationsreaktion mit Phosphat in azidischer Umgebung, was auf die Mineralisation und die Deposition von Kalksalzen hinweist [191]. Es kommt zu einer dunkelgrauen bis tiefschwarzen Anfärbung der mineralisierten Areale, das Zytoplasma hingegen nimmt eine rötlich-pinke und die Zellkerne eine bläulich-grünliche Färbung an.

Alle Schritte der Färbung erfolgten bei Raumtemperatur. Die Von-Kossa-Färbung wurde in den 6-well-Kulturplatten durchgeführt, in denen die Differenzierung durchgeführt worden war. Nach Verwerfen des Mediums wurden die Zellen zweifach mit PBS-Lösung gespült und anschließend in der 6-well-Platte für 15 min mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden dann mit Aqua dest. für 20 min inkubiert und für 5 min mit Silbernitratlösung 5 % in den Kühlschrank verbracht. Hierauf wurde eine zweifache Inkubation mit Aqua dest. für 3 min durchgeführt. Dem schloss sich die Anwendung von Pyrogallussäure 1 % für 5 min, wiederum eine Spülung mit Aqua dest. für 3 min und eine Natriumhydroxidfixierung (5 %) für 5 min an. Nach zweimaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Zellkerne für 10 min mit May-Grünwald-Lösung angefärbt und anschließend wurde wiederum mit Aqua dest. gespült. Hierauf wurden die Zellen mikroskopiert und elektronische Fotoaufnahmen angefertigt (3.2.1).

Öl-Rot-Färbung

Zellen nach erfolgter adipogener Differenzierung und deren Kontrollgruppe wurden mit der Öl-Rot-Färbung bezüglich der Bildung intrazellulärer Lipidvakuolen evaluiert. Alle Schritte der Färbung, falls nicht anders angegeben, erfolgten bei Raumtemperatur. Die Öl-Rot-Färbung wurde in den 6-well-Kulturplatten durchgeführt, in denen die Differenzierung durchgeführt worden war. Nach Verwerfen des Mediums wurden die Zellen zweifach mit PBS-Lösung gespült und anschließend in der 6-well-Platte mit vorgekühlter Formaldehyd-Lösung 4 % 2 min bei - 20 °C fixiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit gekühltem Ethanol 50 % und die Inkubation der Zellen mit Öl-Rot-Lösung 0,2 % in 60 % Isopropanol für 20 min. Es folgte die erneute Applikation von Ethanol 50 % und eine Spülung mit Aqua dest. Danach wurden die Zellen mikroskopiert und elektronische Fotoaufnahmen angefertigt.

Toluidinblau-Färbung

Zur Darstellung der Proteoglykane wurden die Gewebstrukturen aus dreidimensionalen Diffusionskulturen mit Toluidinblau angefärbt. Bei Anfärbung der sauren Glykosaminoglykane mit den enthaltenen Thiazinfarbstoffen erfolgt ein metachromatischer Farbeffekt mit violetter Darstellung.

Alle Schritte der Färbung erfolgten bei Raumtemperatur. Die Toluidinblau-Lösung wurde vor Gebrauch zweifach filtriert. Die Kryoschnitte wurden 5 min in Aqua dest. rehydriert, dann für 3 min in Toluidinblau 1 % in 1 % Natriumtetraboratlösung verbracht und anschließend 120 min in raumtemperiertem Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte die Spülung mit Aqua dest. und die unmittelbare Eindeckung mit DPX. Als Positivkontrolle wurde ein Kryoschnitt eines humanen Gelenkknorpelpräparats gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mikroskopiert und elektronische Fotoaufnahmen angefertigt (s. 3.2.2).

Safranin-O-Färbung

Ebenfalls zur Darstellung der Proteoglykane wurden die Gewebstrukturen aus dreidimensionalen Diffusionskulturen mit Safranin-O angefärbt [192]. Die Intensität der Safranin-O-Färbung korreliert dabei sehr gut mit dem Glykosaminoglykangehalt [193], die Farbeintensität verhält sich sogar direkt proportional zum Nassgewicht der Glykosaminoglykanfraktion von Neoknorpel [194].

Alle Schritte der Färbung erfolgten bei Raumtemperatur. Die Safranin-O-Lösung wurde vor Gebrauch zweifach filtriert. Die Kryoschnitte wurden 5 min in Aqua dest. rehydriert und dann 10 min mit Safranin-O 0,2 % in 1 % Essigsäure gefärbt. Nach dem Spülen mit Aqua dest. erfolgte 10 s die Färbung mit Fast Green 0,04 % in 0,2 % Essigsäure. Dem folgte die Spülung in Aqua dest., die Anwendung von Ethanol 100 %, die zweifache Anwendung von Xylol 100 % und die Eindeckung mit Eukitt. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls ein Kryoschnitt eines humanen Gelenkknorpelpräparats gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mikroskopiert und elektronische Fotoaufnahmen angefertigt.

Neben der qualitativen Beschreibung der Safranin-O-gefärbten Kryoschnittpräparate wurden diese von zwei unabhängigen, verblindeten Personen nach dem „Bern Score“ ausgewertet, einem standardisierten visuellen histologischen Einstufungssystem für *in vitro* generierten Neoknorpel [195]. In diesen Staging-Score gehen drei qualitative Kategorien ein (Tab. 9).

Score	Kategorie (A)	Kategorie (B)	Kategorie (C)
0	Keine Färbung	Hohe Zelldichte ohne Matrix	Kondensiert, nekrotisch, pyknotisch
1	Schwache Färbung dürrtiger Matrix	Hohe Zelldichte mit geringer Matrix (Zellabstand < 1 Zelldurchmesser)	Spindelig, fibrös
2	Mäßige, gleichmäßige Färbung	Mäßige Zelldichte mit Matrix (Zellabstand ≈ 1 Zelldurchmesser)	Gemischt spindelig, fibrös und abgerundet chondrogen
3	Gleichmäßige, kräftige Färbung	Niedrige Zelldichte, ausgiebig Matrix (Zellabstand > 1 Zelldurchmesser)	Hauptsächlich abgerundet chondrogen

Tab. 9 Bern Score: Evaluation mit Safranin-O / Fast Green gefärbten *in vitro* generierten Neoknorpels. Kategorien: (A) Uniformität und Intensität der Safranin-O-Färbung bei 100facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (B) Entfernung der Zellen voneinander / Umfang der EZM bei 200facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (C) Zellmorphologie bei 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Nach [195].

2.2.2.4 Immunhistologie

2.2.2.4.1 Primärantikörper

Als Primärantikörper wurden jeweils monoklonale in der Maus gegen humanes Kollagen vom Typ I und Typ II hergestellte Antikörper vom Typ IgG verwendet (s. 2.1.4).

2.2.2.4.2 Durchführung

Die Färbeschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Nach Rehydrierung der Kryoschnitte in 0,1 % Tween 20 in PBS-Lösung (PBT) für 15 min erfolgte im Trockenschrank bei 37 °C für 30 min die Blockierung der Aktivität der endogenen Gewebesperoxidase durch Zugabe von Wasserstoffperoxid 30 % in Methanol in die Rehydrierungslösung entsprechend 0,3 % Wasserstoffperoxidgehalt. Anschließend wurden die Kryoschnitte für 5 min in PBT gegeben und dann in Chondroitinase 0,25 U/ml in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,0 für 15 min (Gewebskonstrukte aus dreidimensionalen Kultursystemen) bzw. 30 min (humaner Gelenknorpel) bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. An diesen Schritt schloss sich die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegenserum 5 % in PBS-Lösung mit 3 % BSA für 60 min an. Die Schnitte wurde daraufhin mit den Primärantikörpern über Nacht bei + 4 °C inkubiert. Der Primärantikörper gegen Kollagen Typ II wurde dabei in PBS-Lösung 1:6 verdünnt. Als Negativkontrolle wurden Schnitte mit PBS-Lösung ohne

Primärantikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die dreifache Spülung für jeweils 5 min mit PBT. Anschließend wurden die Schnitte 60 min mit dem biotinylierten Anti-Maus-Sekundärantikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:200 in PBS inkubiert. Dem schloss sich wiederum die dreifache Spülung für jeweils 5 min mit PBT an. Es folgte die Anwendung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC-Komplex) für 30 min und die dreifache Spülung mit PBT für jeweils 5 min. Danach wurde 10 min die Detektionssubstanz 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) angewendet. AEC war zuvor in Dunkelheit auf dem Schüttler in DMSO gelöst worden. Anschließend war diese Lösung in Natriumacetat-Puffer pH 5,5 filtriert worden. Kurz vor Beginn der Detektion war Wasserstoffperoxid hinzugegeben worden. Die Detektion wurde dann mit Leitungswasser gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte für 120 s mit saurer Hämalaunlösung (nach P. Mayer) und die Bläuung in Leitungswasser für 10 min. Hierauf wurden die Schnitte mit Aquatex fixiert und für 24 h im Dunkeln getrocknet. Zuletzt wurden die Schnitte mikroskopiert und elektronische Fotoaufnahmen angefertigt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Isolierung und Quantifizierung der RNA aus Zellen (Monolayer)

Aus Zellen nach osteogener und adipogener Differenzierung sowie aus in Monolayer kultivierten pHC am Ende jeder Passage wurde die gesamte RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits für die RNA-Isolierung aus 10^6 – 10^7 Zellen isoliert und anschließend quantifiziert. Die Isolierung erfolgt hierbei durch selektive Bindung der Gesamt-RNA mit einer Nukleotidlänge > 200 an eine in einer Mini-Spin-Säule angebrachten Silika-Membran.

Zunächst wurden die Zellen nach Verwerfen des Mediums zweifach mit PBS gespült und mittels Trypsin abgelöst (s. 2.2.1.1.7). Nach Stoppen der Reaktion mit dem jeweiligen Medium wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in Medium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden sie erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen dann in PBS-Lösung resuspendiert und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen bei Zellzahlen bis 5×10^6 in $350 \mu\text{l}$ bei Zellzahlen zwischen 5×10^6 und 10^7 in $700 \mu\text{l}$ 2-Mercaptoethanol enthaltenden RLT-Lysis-Puffer aus dem o.g. Kit sorgfältig und vorsichtig resuspendiert.

Dieses Lysat wurde mit Ethanol 70% im Volumenverhältnis 1:1 in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, um eine spätere selektive Bindung der Gesamt-RNA an die Silika-Membran zu gewährleisten. Anschließend wurde die Suspension auf die Silika-Membran der Mini-Spin-Säule pipettiert und diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt. Letzteres wurde anschließend in der Tischzentrifuge bei 8000 g 20 s zentrifugiert und der Durchfluss aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß verworfen. Hierauf wurden $350 \mu\text{l}$ des im Kit enthaltenen RW1-Puffers auf die Mini-spin-Säule pipettiert, diese erneut bei 8000 g 20 s zentrifugiert und der Durchfluss

verworfen. Für einen enzymatischen, säulenseitigen DNA-Verdau wurden anschließend 80 µl der aus 10 µl DNase Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer aus dem RNase-Free DNase Set bestehenden DNase-Lösung auf die Mini-Spin-Säule gebracht und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Hierauf wurden erneut 350 µl RW1-Puffer auf die Mini-spin-Säule pipettiert, diese bei 8000 g 20 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µl des im Kit enthaltenen RPE-Puffers auf die Mini-spin-Säule pipettiert, diese bei 8000 g 20 s zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Anschließend wurden erneut 500 µl RPE-Puffer aufpipettiert und die Mini-spin-Säule zweifach bei 8000 g 2 min zentrifugiert und der Durchfluss jeweils entfernt. Zuletzt wurde die Mini-spin-Säule in einem sauberen RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert und nach Aufpipettieren von 30 µl RNase-freien Wassers die Gesamt-RNA durch Zentrifugation (8000 g, 1 min) eluiert. Das gewonnene RNA-Eluat wurde unmittelbar auf Eis gelagert. Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden spektralphotometrisch bestimmt. Hierzu wurde nach Entnahme eines Aliquotvolumens der RNA-Lösung eine Verdünnung (1:25) angefertigt und deren Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Daraus wurde die Konzentration der Gesamt-RNA-Lösung errechnet. Der Reinheitsgrad wurde anhand der Ratio aus Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge (A_{260}/A_{280}) insbesondere hinsichtlich Kontaminationen mit Proteinen abgeschätzt. Es wurde nur RNA mit einer Ratio (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,7 und 2,1 verwendet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.2 Isolierung und Quantifizierung der RNA aus dreidimensionalen Kultursystemen

Gewebskonstrukte aus der Pelletkultur wurden nach Absaugen des Mediums mehrfach mit PBS-Lösung gespült, anschließend vorsichtig in PBS-Lösung unter Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze (10³ µl) in RNase freie Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und hier nochmals vorsichtig mit PBS-Lösung gespült. Anschließend wurde die verbliebene PBS-Lösung möglichst vollständig abpipettiert. Das Vorgehen bei Gewebskonstrukten aus der Membrankultur verlief analog, wobei diese zuvor mit einem sterilen Skalpell scharf von der Zelluloseazetatmembran abgetrennt wurden. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Lysis der Proben auf Phenolbasis mittels RNeasy Lipid Tissue Kit nach demselben wie in 2.2.3.1 beschriebenem Prinzip der Silika-Membran-Bindung. Zuvor wurden die Gewebskonstrukte aus beiden Kultursystemen allerdings in einem Mikrodismembrator S pulverisiert. Hierzu wurden diese zunächst in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen tiefgefroren. Ebenso wurden sterile Edelstahlkugeln mit einem dem Innendurchmesser des Querschnitts der Kryoröhrchen identischen Durchmesser gekühlt. In ein solches jeweils eine Kultur enthaltendes Kryoröhrchen wurde jeweils eine Edelstahlkugel transferiert, das Kryoröhrchen erneut in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend in ein ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Teflongefäß in einer Einspannvorrichtung des Mikrodismembrators S eingebracht. In diesem wurde das Kryoröhrchen in einer einen Kreisbogen

nachvollziehenden Bewegung repetitiv geschüttelt (3000 rpm, 1 min), so dass die in dem Kryoröhrchen vorhandene Kugel das Gewebskonstrukt pulverisierte. Nach steriler Entfernung der Edelstahlkugel mittels Stabmagneten wurde das entstandene Pulver in 750 µl Phenol-haltiger Qiazol-Reagenz aufgenommen. Zu diesem Lysat wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die entstandene Lösung pipettierend homogenisiert, anschließend für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt bei 4 °C 15 min bei 12×10^3 g zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen auftrennten. Eine obere wässrige, die Gesamt-RNA enthaltende Phase, eine weißliche Interphase und eine untere rötliche, organische Phase. Die obere farblose Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und hier mit einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Ethanol 70% gemischt. Das weitere Vorgehen entsprach nach Aufpipettieren dieser Suspension auf die Silika-Membran der Mini-Spin-Säule den in 2.2.3.1 beschriebenen Versuchsschritten.

2.2.3.3 Reverse Transkription

Reverse Transkription der RNA für die qualitative PCR

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA in für die qualitative PCR zu verarbeitende cDNA erfolgte mittels Reverse-Transkriptase Kit der Firma Promega. Hierzu wurde die Gesamt-RNA 10 min bei 70 °C erhitzt und währenddessen der Mastermix-Ansatz hergestellt und stets auf Eis gelagert. Hierzu wurden pro Reaktion (einfacher Ansatz) 4 µl 25mM MgCl₂, 2 µl 10x RT-Puffer, 2µl dNTP-Lösung, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 0,6 µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl Random Primer pipettiert. Zu den 10,4 µl Mastermix pro Reaktion wurde jeweils das 1,0 µg Gesamt-RNA enthaltende Volumen in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und die entstandene Lösung auf ein Gesamtvolumen von 20,0 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe im Thermocycler für 10 min auf 25 °C, hiernach für 60 min auf 42 °C und zuletzt für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden hierauf 5 min auf Eis gestellt und bei -20 °C gelagert.

Reverse Transkription der RNA für die quantitative Real-Time-PCR (Light-Cycler®)

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA in für die quantitative Real-Time-PCR (Light-Cycler®) zu verarbeitende cDNA erfolgte mittels Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit der Firma Roche. Auch hierbei wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Wie in 2.2.3.3 beschrieben wurde wiederum das 1 µg Gesamt-RNA enthaltende Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 9,4 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden pro Reaktion 2 µl Random-Primer hinzugefügt und die PCR-Reaktionsgefäße im Thermocycler 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Währenddessen wurde der Mastermix-Ansatz hergestellt. Hierbei wurden pro Reaktion (einfacher Ansatz) 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Lösung, 1,0 µl DTT, 0,5 µl Protector RNase-Inhibitor und 1,1 µl Reverse Transkriptase pipettiert. Zu den 8,6 µl Mastermix pro Reaktion wurden 9,4 µl Gesamt-RNA in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Es folgte die Erhitzung im Thermocycler für 30 min auf 50

°C und für 5 min auf 85 °C. Die Proben wurden hierauf 5 min auf Eis gestellt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR)

Mit Hilfe der qualitativen RT-PCR wurde eine Genexpressionsanalyse der osteogen und adipogen differenzierten hMSC durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primer sind 2.1.5 zu entnehmen. Zunächst wurde der Mastermix-Ansatz auf Eis vorbereitet, dessen Zusammensetzung Tab. 9 zu entnehmen ist.

Mastermix-Komponente	Volumen pro Reaktion (einfacher Ansatz)
Primer sense 10 mM	0,5 µl
Primer antisense 10 mM	0,5 µl
PCR-Puffer 10x	2 µl
dNTP 25 mM	0,2 µl
MgCl ₂ 25 mM	1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
RNase-freies Wasser	14,7 µl
cDNA (neg. Kontrolle: RNase-freies Wasser)	1 µl

Tab. 10 Komponenten des Mastermix-Ansatzes der qualitativen PCR.

Als endogene Kontrolle wurde die Expression des Haushaltsgens GAPDH evaluiert, als Negativkontrolle wurde dem Ansatz statt 1 µl cDNA 1 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Eingesetzte Primer, deren Sequenzen, Amplifikatlänge und verwendete Annealing-Temperaturen sind in 2.1.5 enthalten. Als tatsächliche Annealing-Temperatur wurde der Mittelwert der eingesetzten Primer verwendet. Die einzelnen Schritte der Amplifikation erfolgten im Thermocycler und sind Tab. 10 zu entnehmen.

Vorgang	Dauer	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	3 min	95	1
Amplifikation	30 s	95	35
	45 s	[siehe Text]	
	1 min	72	
Endpolymerisation	10 min	72	1
Ende	„Forever“	4	

Tab. 11 Amplifikationsschritte der qualitativen PCR (Thermocycler).

Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert. Während der PCR war zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate ein Agarose-Gel (2%) gegossen

worden. Hierzu wurden zunächst 90 ml Aqua dest. mit 10 ml TAE-Puffer (10x) in einem Erlenmyer-Kolben gemischt und diesem 2,0 g Agarose hinzugefügt. Nach Erhitzen in der Mikrowelle und nach Abkühlen auf ca. 40 °C wurden 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) unter ständigem Rühren hinzupipettiert. Nach Eingießen in die Elektrophorese-Kammer erfolgte für 30 min die Polymerisation des Gels.

Anschließend wurden die Amplifikate der PCR mit 3 µl Ladepuffer (6x) versetzt und 12 µl dieser Lösung in die Taschen des Gels pipettiert. Dies erfolgte analog mit 5 µl einer Nukleotidleiter (100 bp) in die flankierenden Geltaschen. Anschließend wurden die Amplifikate und Nukleotidleiter durch Anlegen einer Spannung von 75 V bei einer Stromstärke von 66 mA für 90 min aufgetrennt und mit dem molekularen Imager Fluor-S MultImager dargestellt sowie fotodokumentiert.

2.2.3.5 QRT-PCR (Quantitative Real-Time-PCR, Light-Cycler®)

Die semiquantitative Erfassung der Genexpression molekularer Marker der Chondrogenese mittels qRT-PCR (Light-Cycler®) erfolgte aus in Monolayer kultivierten Chondrozyten und aus den Gewebskonstrukten aus den dreidimensionalen Kultursystemen. Dem Prinzip liegt die unspezifische DNA-Doppelstrang-Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I zu Grunde. Die verwendeten Primer der Zielgene finden sich in 2.1.5. Die jeweiligen Primerkits enthielten die jeweiligen Primerpaare in MgCl₂-Lösung, die Standard-Stabilisatoren, die Standardlösungen mit definierter Kopienzahl/µl Standard-cDNA sowie eine Positiv-Kontrolle. 1,0 µl der in den in 2.2.3.4 beschriebenen Schritten generierten cDNA wurde zunächst 1:10 mit RNase-freiem Aqua dest. verdünnt und in LightCycler®-Glaskapillaren pipettiert. Diesem Volumen wurden jeweils 10,0 µl des in Tab. 11 dargestellten Mastermix-Ansatzes hinzugefügt und die Kapillaren nach Einbringen in einen Zentrifugenadapter bei 2000 rpm für 10 s bei 4 °C zentrifugiert. Die Kapillaren wurden anschließend nach Einsetzen in den LightCycler®-Rotor in den LightCycler® verbracht und die Reaktion gestartet.

Mastermix-Komponente	Volumen pro Reaktion (einfacher Ansatz)
Primerlösung (sense und antisense)	2 µl
FastStart DNA Master SYBR Green I (DNA-Polymerase, Reaktions-Puffer, MgCl ₂ , dNTP und SYBR Green I dye)	2 µl
RNase-freies Wasser	6 µl

Tab. 12 Komponenten des Mastermix-Ansatzes der qRT-PCR.

Der fluoreszierende DNA-Interkalator Sybr Green I diente der Real-Time-Detektion während der exponentiellen Amplifikation der spezifischen DNA-Stränge. Als Berechnungsgrundlage der Effizienz eines jeden Laufes dienten je Primerpaar drei Standardverdünnungen (10^0 – 10^{-2}), welche jeweils im Duplikat angesetzt wurden. Um

die Vergleichbarkeit einzelner Experimente sicherzustellen wurde ein Effizienzunterschied von bis zu 0,05 akzeptiert. Als endogene Kontrolle im Sinne eines internen Standards jeder Probe wurde die Expression des konstant exprimierten Haushaltsgens Cyclophilin B evaluiert, als Negativkontrolle wurde dem Ansatz wiederum statt 10 µl cDNA 10 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Die einzelnen Schritte der Amplifikation erfolgten im LightCycler® 2.0 und sind Tab. 12 zu entnehmen.

Vorgang	Dauer	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	10 min	95	1
Amplifikation	10 s	95	35
	10 s	68	
	16 s	72	

Tab. 13 Amplifikationsschritte der quantitativen PCR (LightCycler® 2.0).

Nach erfolgter Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durch Erhitzen von 58 °C bis 95 °C zum Nachweis der Spezifität der Amplifikate anhand Fragmentlängenbestimmung durchgeführt. Die relative Quantifizierung der Expression spezifischer Zielgene erfolgte als Quotient aus den Crossing points der zu untersuchenden Zielgene und jeweils des Cyclophilin B. Der Crossing point ist der (Cp-)Wert, der denjenigen Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der Cp-Wert wurde anhand der Fit-Point-Methode ermittelt. Nach Festlegung einer Noise-band wurde hierbei die Fluoreszenzsteigung während der exponentiellen Amplifikationsphase durch Punktanalyse ermittelt. Die hierbei erhaltenen Crossing points verhielten sich umgekehrt proportional zur logarithmischen Anzahl der Produktkopien.

2.2.4 Assay zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane

Zur Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts der Gewebskonstrukte aus dreidimensionalen Kultursystemen wurde ein DMMB-Bindungsassay etabliert [196,197]. Diesem liegt als Prinzip die Änderung des Absorptionsspektrums des 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) bei dessen Bindung an sulfatierte Glykosaminoglykane zugrunde [196,198].

2.2.4.1 Quantifizierung des DNA-Gehalts aus dreidimensionalen Kultursystemen

Zur Normalisierung des in jeder Probe ermittelten Glykosaminoglykangehalts wurde zunächst die DNA-Konzentration mit dem QuantiFluo DNA Assay Kit fluoreszenzspektrometrisch ermittelt [197]. Der Methode liegt die spezifische Bindung des Farbstoffs Hoechst 33258 an Doppelstrang-DNA zu Grunde, wobei sich die

Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 460$ nm direkt proportional zur DNA-Konzentration verhält.

Hierfür wurden jeweils zwei Zellpellets bzw. eine leitschienefreie Membrankultur nach dreifachem Spülen mit PBS-Lösung in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und hier erneut mit PBS-Lösung gewaschen. Die Zellkonstrukte wurden darauf in einer 10 µg/ml Proteinase-K, 30 mM Tris (pH 7,8), 50 mM NaCl und 10mM MgCl₂ enthaltenden Lösung für 16 Stunden bei 65 °C inkubiert und dann durch repetitives Einfrieren bei -80 °C und auftauen lysiert. Die Zelllysate wurden in einer Verdünnungsreihe mit TE-Puffer (10 mM Tris, 1mM Na₂EDTA, pH 7,4) versetzt. Sie wurden anschließend in einer 96-well-UV-Platte nach Zugabe der Hoechst Dye 33258 enthaltenden Lösung gegen eine ebenfalls aus einer Verdünnungsreihe ermittelten, dreifach pipettierten Standardkurve (DNA vom Kalbsthymus) im FluoStar Optima fluoreszenzspektrometrisch gemessen ($\lambda_{exc} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm). Die Messung erfolgte zehnfach. Die Konzentration jeder Probe wurde anhand der Standardkurve (0 – 2000 ng/ml) durch das Programm Optima Software 2.20 errechnet.

2.2.4.2 Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts aus dreidimensionalen Kulturen

Auch hierfür wurden wie in 2.2.4.1 beschrieben mit Proteinase-K behandelte Zelllysate mit jeweils 40 µl Gesamtvolumen in eine Verdünnungsreihe gebracht (1:2 – 1:32) und mit 250 µl einer 1,9-Dimethylmethylenblau-Farbstoff-Lösung (pH 3,5) versetzt. Für letztere wurden zunächst 2,0 g Natriumformiat in 993 ml Aqua dest. aufgelöst und 2,0 ml Ameisensäure 98–100 % hinzugefügt. Dieser Lösung wurden 16 mg 1,9-Dimethylmethylenblau in 5,0 ml Ethanol 100% gelöst hinzugefügt und die Lösung schließlich auf einen pH von 3,5 einstellend auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Absorption gegen eine ebenfalls aus einer Verdünnungsreihe ermittelten, dreifach pipettierte Standardkurve (Chondroitin-6-Sulfat vom Haiknorpel) bei $\lambda_{abs} = 595$ nm photometrisch gemessen. Die Messung erfolgte ebenfalls zehnfach. In analoger Weise wurde die Konzentration jeder Probe anhand der Standardkurve (0 – 75 µg/ml) durch das Programm Optima Software 2.10 errechnet.

2.2.4.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Prism 3.0 verwendet. Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens doppelt durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 festgelegt. Für die in 3.1 angewandten statistischen Tests wurde der Student's T-Test, für die in 3.3 angewandten der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung humaner Chondrozyten

3.1.1 Kultivierung in Monolayer

Nach Aussaat der pHc in Monolayer-Kultur zeigten diese in den ersten zwei Passagen (P0, P1) eine runde bis polygonale Morphologie (Abb. 8, (A) und (B)). Auffallend war in diesen Passagen die deutliche Kohäsionsneigung unter Ausbildung einzelner Zellgruppen mit jeweils zwei bis fünf pHc. Im Laufe der weiteren Kultivierung (P3) formten die Zellen spindelförmige Ausläufer und verteilten sich regelmäßig auf der Oberfläche der Kulturflaschen ohne Ausbildung einzelner Zellgruppen (Abb. 8, (C) und (D)). Sie zeigten ab der dritten Passage ein mit zunehmender Kultivierung festzustellendes fibroblastenähnliches Wachstumsmuster bei abnehmender Chondrozyten-typischer Morphologie (P5; Abb. 8, (E) und (F)).

Die relative Quantifizierung des Kollagen Typ II (COL2A1-mRNA/Cyclophyllin-B-mRNA) ergab unmittelbar nach Isolierung (P0) 38,0 und nahm nach Aussaat in die Monolayer-Kultur bis zum Ende der ersten ($1,0 \times 10^{-4}$) und zweiten Passage ab ($1,1 \times 10^{-6}$) (Abb. 11). Am Ende der dritten Passage sowie in allen höheren Passagen war mittels qRT-PCR keine Expression des Kollagens Typ II (COL2A1-mRNA) mehr nachweisbar (Abb. 11).

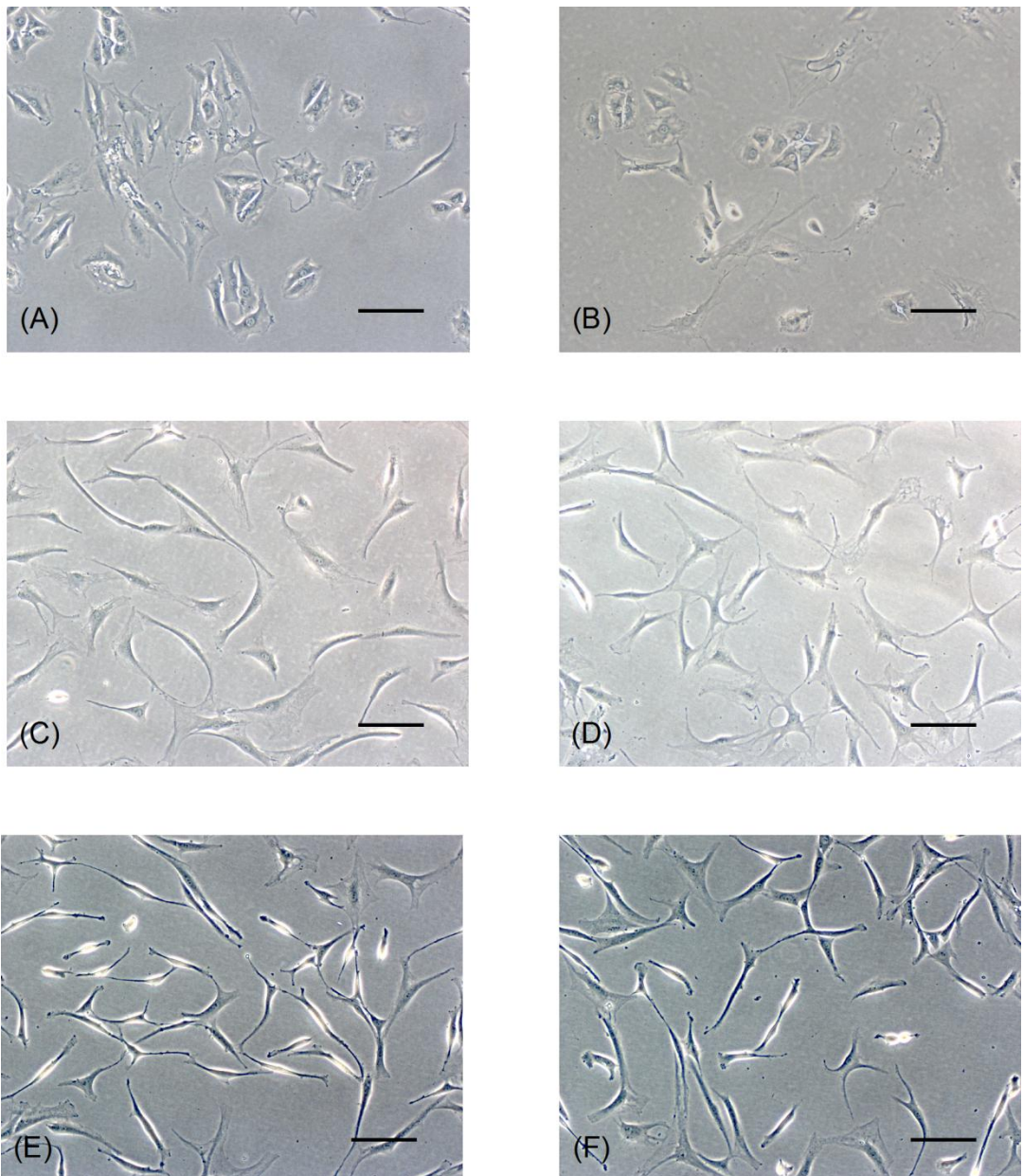


Abb. 8 Kultivierung von phC in Monolayer-Kultur. In (A) und (B) sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach Adhäsion zwei Tage nach Isolierung aus humanem Gelenkknorpel abgebildet (P0). Die Chondrozyten liegen in Gruppen aus zwei bis fünf Zellen unter Ausbildung intensiver und dichter Zell-Zell-Kontakte zusammen und sind rund-chondroblastär konfiguriert. In P3 verlieren die Zellen allmählich die engen Zellkontakte und werden zunehmend spindelförmiger ((C) und (D)). Zellen in P5 weisen eine dedifferenzierte, mesenchymal-fibroblastäre, schlank-spindelförmige Phänotypie bei weitem Zellabstand auf ((E) und (F)). Insgesamt ist so im Laufe der sukzessiven Zellpassagierung eine phänotypische, fibroblastäre Dedifferenzierung festzustellen. Balken = 100 μm .

3.1.2 Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen

3.1.2.1 Makroskopische Erscheinung

Nach sieben Tagen Kultivierung der pH_C in der Membrankultur bildeten diese eine flexible, scheibenförmige Struktur mit apikalem Dom mit einem Durchmesser von ca. $4 \times 10^3 \mu\text{m}$ und einer Höhe von ca. $1,5 \times 10^2 \mu\text{m}$ aus, nachdem sie am Ende der ersten Passage aus der Monolayer-Kultur überführt worden waren (Abb. 9, (A)). Aus am Ende fortgeschrittener Passagen (ab P5) überführte pH_C bildeten Membrankulturen kleineren Durchmessers (ca. $2\text{--}3 \times 10^3 \mu\text{m}$), jedoch leicht zunehmender Höhe aus (ca. $2,5 \times 10^2 \mu\text{m}$).

Als Pelletkulturen kultivierte pH_C formten nach sieben Tagen glatte, spheroidale Strukturen mit einem Durchmesser von ca. $10^3 \mu\text{m}$, bis zur fünften Passage unabhängig davon, aus welcher Passage der Monolayer-Kultivierung die Zellen in die Pelletkultur überführt wurden. Ab der fünften Passage bildeten sich kleinere, instabilere Pellets aus, die sich teilweise während der Kultivierung auflösten.

Membran- und Pelletkulturen zeigten nach 21 Tagen Kultivierung ähnliche makromorphologische Resultate bei insgesamt jedoch deutlich geringeren Gesamtgrößen.

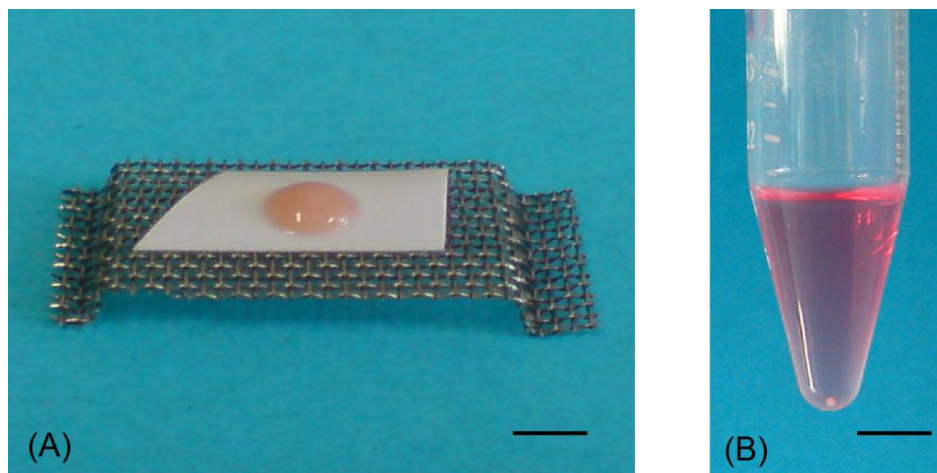


Abb. 9 Makroskopische Erscheinung der Membrankultur (A) und Pelletkultur (B) im Rahmen der Kultivierung von pH_C. (A) Die sich auf dem Zelluloseazetatfilter ausgebildete knorpelige-Scheibe wieß nach Überführung von pH_C aus Monolayer-Kulturen früher Passagen (s. Text) einen Durchmesser von 4–5 mm auf. Die Stahlbrücke samt Filter und Gewebe ist zur Veranschaulichung aus der Petrischale entfernt. (B) Bei den Pelletkulturen formten sich kleine, frei im Konus des Zentrifugenröhrchens flottierende Zellpellets eines Durchmessers von ca. $10^3 \mu\text{m}$ [199]. Balken = ~ 5 mm.

3.1.2.2 Histologie und Immunhistologie

Nach sieben Tagen Kultivierung zeigten am Ende der ersten Passage in die Membrankultur überführte pH_C eine hohe Zelldichte bei rund-ovaler Zellmorphologie (Abb. 10; (MK), (P1)). Die Membrankulturen wiesen histologisch bei bis zu 400-

facher Vergrößerung allseits eine glatt-begrenzte Oberfläche auf. Besonders regelmäßig und eben zeigte sich die der Zelluloseazetatmembran zugewandte Auflagefläche. Die Membrankulturen in P1 wiesen eine positive Toluidinblau- und Safranin-O-Färbung in allen Anteilen der Kultur auf (Abb. 10; (MK), (P1), (TOL), (SAF)). Membrankulturen, die aus am Ende der fünften Monolayer-Passage überführten pHc entstanden (Abb. 10; (MK), (P5)), wiesen eine geringere Zelldichte und Zellen mit spindelförmig-fibroblastenartiger Struktur auf. Die EZM erschien dabei eher retikulär und locker bei schwächerer Toluidinblau- und Safranin-O-Färbung (Abb. 10 (MK), (P5), (TOL), (SAF)). Während in Membrankulturen aus P1 (Abb. 10; (MK), (P1), (COL)) und P2 (Daten nicht gezeigt) um viele Zellen immunhistochemisch eine Expression von Kollagen Typ II nachgewiesen werden konnte, war ein immunhistologischer Nachweis von Kollagen Typ II in Membrankulturen ab P3, so auch in P5, nicht mehr möglich (Abb. 10; (MK), (P5), (COL)).

Pelletkulturen wiesen nach sieben Tagen Kultivierung in den jeweiligen Passagen ähnliche Resultate wie die Membrankulturen auf. In den niedrigen Passagen (P1–P3) war eine hohe Zelldichte mit runden Zellen und kräftiger Toluidinblau- und Safranin-O-Färbung sowie positivem immunhistologischem Signal für Kollagen Typ II festzustellen (Abb. 10; (PK), (P1)). Bis P5 nahm in Analogie zu den Membrankulturen die Färbung mit Toluidinblau und Safranin-O ab (Abb. 10; (PK), (P5), (TOL), (SAF)). Wie bei den Membrankulturen war der Nachweis einer Kollagen-Typ-II-Expression immunhistologisch ab P3, so auch wiederum in P5, nicht mehr zu führen (Abb. 10; (PK), (P5), (COL)).

Insgesamt erschienen sowohl Zelldichte als auch histologische sowie immunhistologische Färbungen in P1 bei den Pelletkulturen schwächer im Vergleich zu denen der Membrankulturen derselben Passage.

Nach 21 Tagen Kultivierung zeigten beide Kultursysteme kein immunhistochemisches Signal für Kollagen Typ II. Die Färbungen mit Toluidin-Blau und Safranin-O waren bei zellarmen, retikulären Gewebsstrukturen in sämtlichen Passagen insgesamt wesentlich schwächer als nach sieben Tagen Kultivierung.

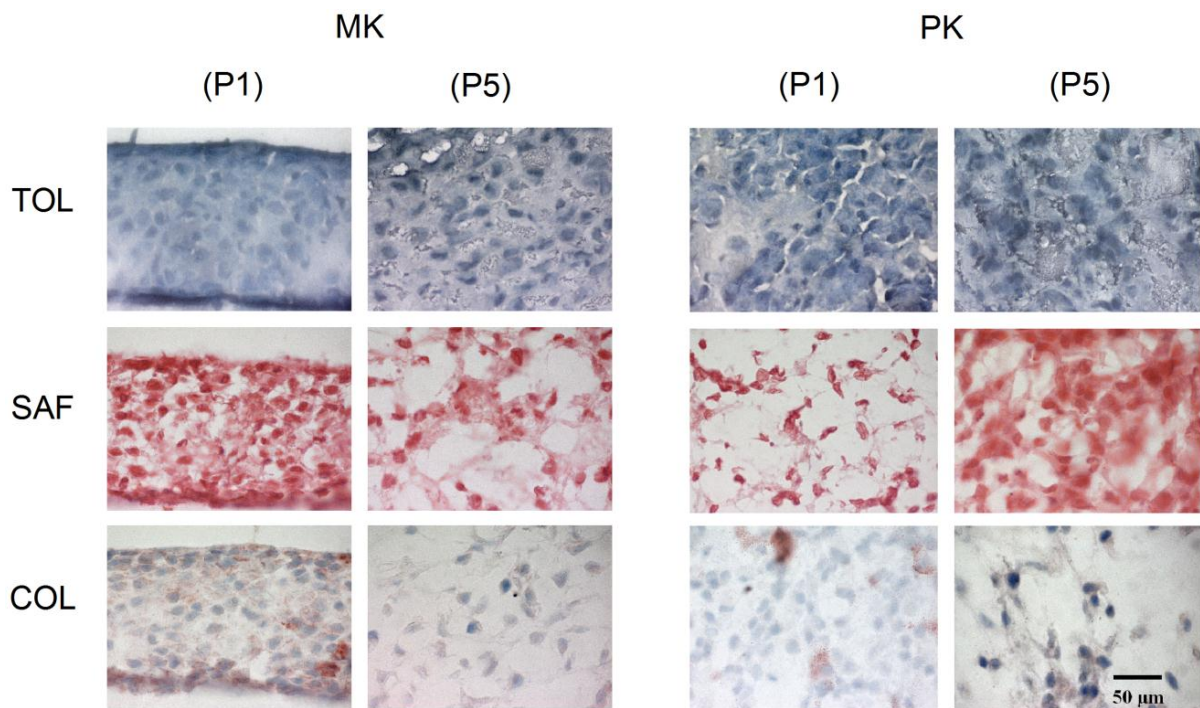


Abb. 10 Histologische und immunhistologische Evaluation der der Kultivierung der der pHc in Membrankulturen (MK) und Pelletkulturen (PK) mittels Toluidinblau (TOL), Safranin-O (SAF) Kollagen Typ II (COL). Dargestellt sind pHc, welche am Ende der ersten (P1) und fünften (P5) Passage in Monolayer-Kultur in die dreidimensionalen Kultursysteme überführt wurden [199].

3.1.2.3 Relative Quantifizierung der Kollagen-Typ-II-Expression

Im Vergleich zur Expression des Kollagen Typ II der pHc in Monolayer am Ende derjenigen Passage, aus der die Zellen in die dreidimensionalen Kultursysteme überführt wurden, wiesen sowohl Membrankulturen als auch Pelletkulturen nach 7 Tagen Kultivierung von P1 bis P3 eine signifikant höhere Expression auf ($p < 0,05$) (Abb. 11). Membrankulturen zeigten in P1 eine signifikant höhere ($p < 0,05$), in P2 und P3 eine nicht-signifikant geringere Kollagen-Typ-II-Expression als Pelletkulturen. In P3 war im Gegensatz zu den Zellen in Monolayer, in denen keine Kollagen-Typ-II-Expression mehr nachweisbar war, in den aus diesen Zellen generierten dreidimensionalen Kultursystemen wieder eine Expression von Kollagen Typ II nachzuweisen. Hingegen konnte ab P4 weder in Monolayer-Kulturen noch in dreidimensionalen Kultursystemen eine Kollagen-Typ-II-Expression nachgewiesen werden. Nach 21 Tagen Kultivierung zeigten Membrankulturen in keiner Passage eine Kollagen-Typ-II Expression, Pelletkulturen lediglich in P1 ($5,0 \times 10^{-4}$ COL2A1-mRNA/Cyclophyllin-B-mRNA).

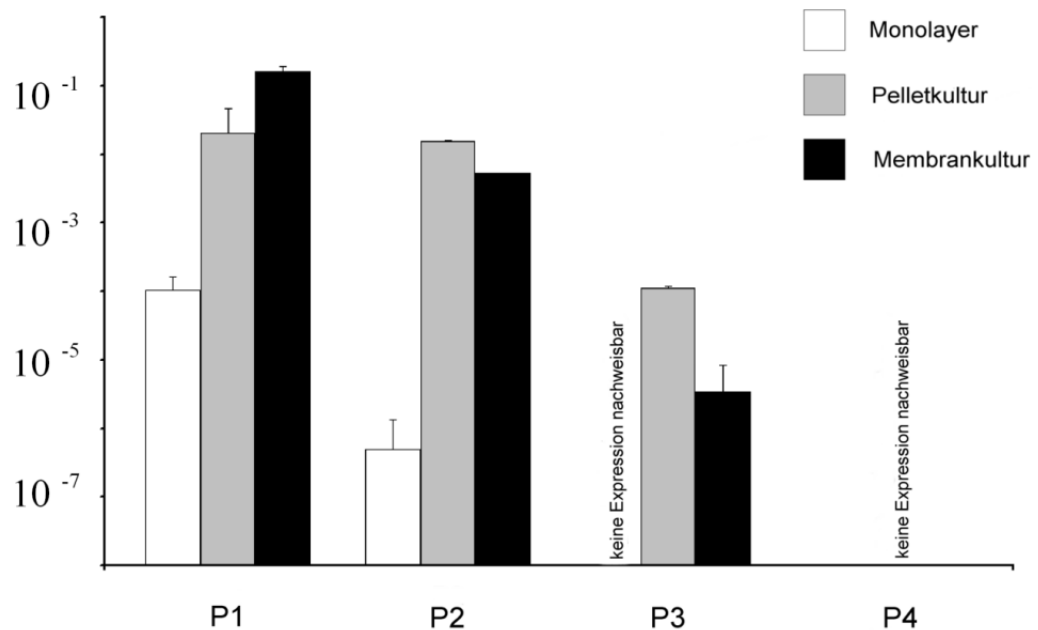


Abb. 11 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR der Expression des Kollagens Typ II (COL2A1) in pHC aus Monolayer- (weiß), Pellet- (grau) und Membrankulturen (schwarz) in den Passagen 1 bis 4 (P1–P4). Die relative Quantifizierung des Kollagens Typ II ergab unmittelbar nach Isolierung (P0) eine Ratio COL2A1-mRNA/Cyclophillin-B-mRNA von 38,0. Die Kultivierung in dreidimensionalen Kultursystemen erfolgte für sieben Tage. Die relative Expression ist als mRNA-Quotient aus Kollagen Typ II und Cyclophillin B (COL2A1-mRNA/Cyclophillin-B-mRNA) dargestellt [199].

3.2 Osteogene und adipogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

3.2.1 Osteogene Differenzierung

Nach 21 Tagen osteogener Differenzierung war in sämtlichen differenzierten Kulturen eine positive von-Kossa-Färbung festzustellen (Abb. 12, (A), (B)), während bei nicht-differenzierten hMSC (Kontrollen) kein Nachweis einer Phosphatablagerung erbracht wurde (negative von-Kossa-Färbung; Abb. 12, (C)). Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen den Nachweis einer Expression von Kollagen Typ I (COL1A2; Abb. 12; (D), (COL)) und Osteopontin (Abb. 12; (D), (OP)). Bei nachgewiesener Expression des Haushaltsgens GAPDH in beiden Gruppen (Abb. 12; (D), (GAPDH)) war in der Kontrollgruppe keine Expression des Kollagens Typ I und Osteopontins nachzuweisen (Abb. 12, (D), (COL), (OP)).

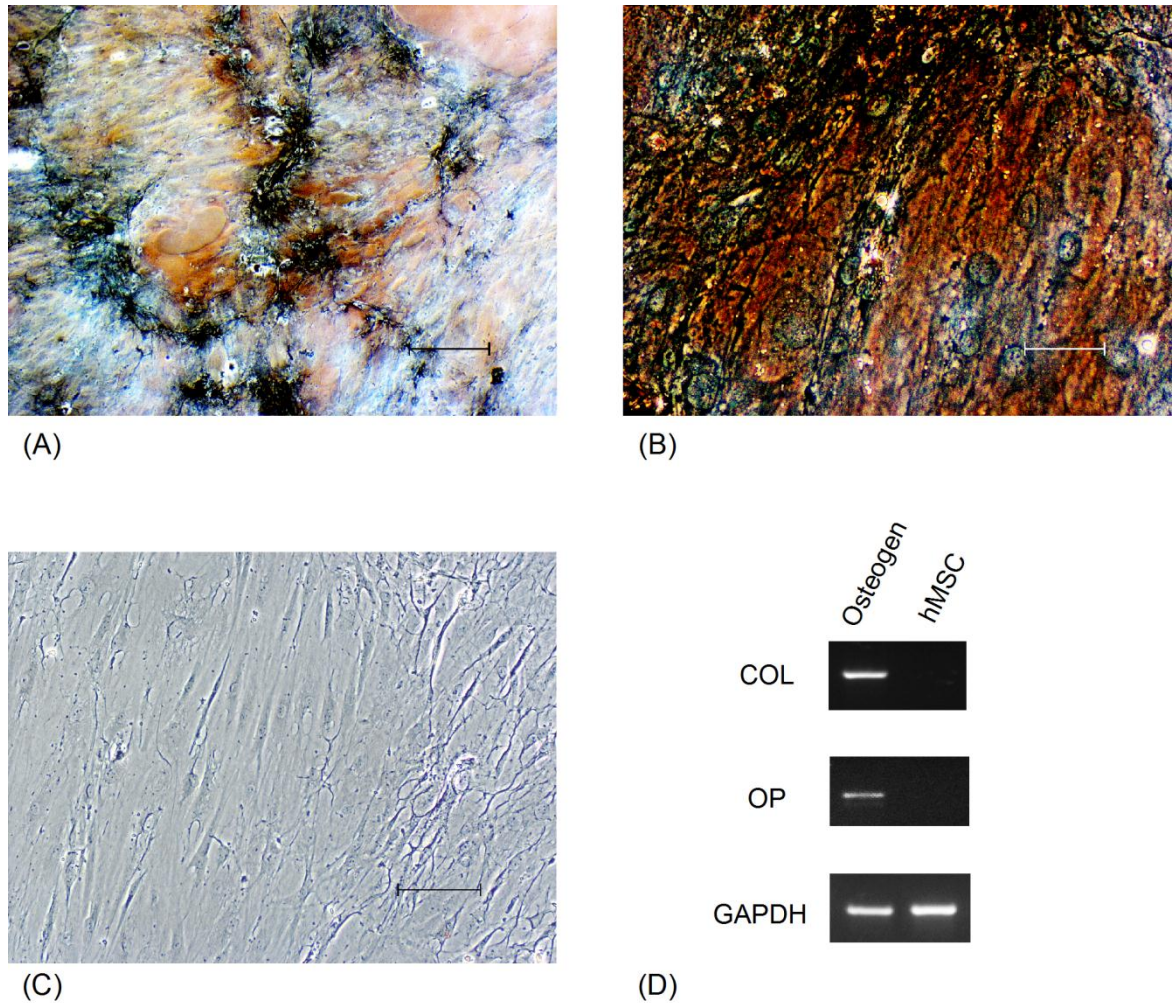


Abb. 12 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (Osteogen) in Monolayer-Kultur. Positive Von-Kossa-Färbung ((A), Balken = 400 μm, (B), Balken = 100 μm) und Expression (D) von Kollagen Typ I (COL1A2, 480 bp, (COL)) sowie Osteopontin (480 bp, (OP)). In den Negativkontrollen (hMSC; dreiwöchige Kultivierung von hMSC in Monolayer-Kultur) waren weder in der Von-Kossa-Färbung (C) Kalzifizierungen detektierbar noch war eine Expression von Kollagen Typ I oder Osteopontin nachweisbar (D). In sämtlichen Proben (osteogene Differenzierung, Negativkontrolle) wurde eine Expression des Referenzgens GAPDH (416 bp) nachgewiesen (D).

3.2.2 Adipogene Differenzierung

Während der adipogenen Differenzierung der hMSC bildeten sich nach ca. 10 Tagen lichtmikroskopisch deutlich erkennbare, intrazelluläre Fettvakuolen aus. Nach 21 Tagen Differenzierung zeigten differenzierte Zellen im Gegensatz zur Kontrollgruppe (nicht-differenzierte hMSC; Abb. 13, (C)) eine positive Öl-Rot-Färbung und damit aus Neutralfetten bestehende intrazelluläre Vakuolen (Abb. 13, (A), (B)). Gemeinsam mit einer Positivkontrolle (humanes subkutanes Fettgewebe) war bei adipogen differenzierten hMSC eine Expression von Leptin und PPAR- γ festzustellen (Abb. 13, (D)). Bei Expressionsnachweis des Haushaltgens GAPDH in sämtlichen Proben

zeigte sich in der Negativkontrolle keine Expression von Leptin und PPAR- γ (Abb. 13, (D)).

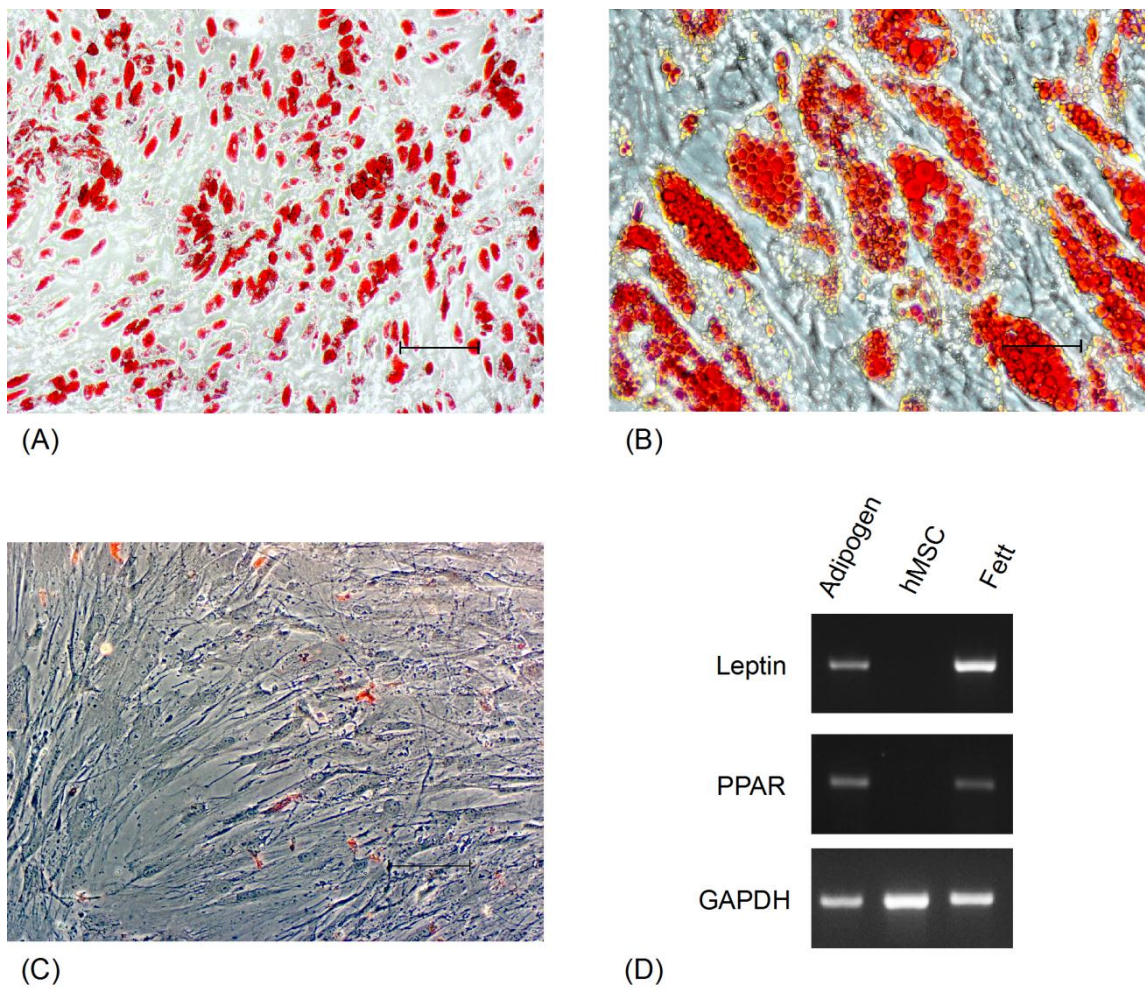


Abb. 13 Adipogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (Adipogen) in Monolayer-Kultur. Nachweis von Fettvakuolen in der Öl-Rot-Färbung ((A), Balken = 400 μ m, (B), Balken = 60 μ m) und Expression von Leptin (500 bp, (D)) sowie PPAR- γ (347 bp, (D)). Expressionsnachweis von Leptin und PPAR- γ in einer Positivkontrolle (humanes subkutanes Fettgewebe). In den Negativkontrollen (hMSC; dreiwöchige Kultivierung von hMSC in Monolayer-Kultur) waren weder in der Öl-Rot-Färbung (C) die Bildung von Fettvakuolen detektierbar noch eine Expression von Leptin oder PPAR- γ (D) nachweisbar. Expression von GAPDH (416 bp) in sämtlichen Proben (D).

3.3 Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Kultursystemen

3.3.1 Kultivierung in Monolayer

Für die chondrogene Differenzierung wurden hMSC zunächst wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert. Dabei erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle und Fotodokumentation (Abb. 14).

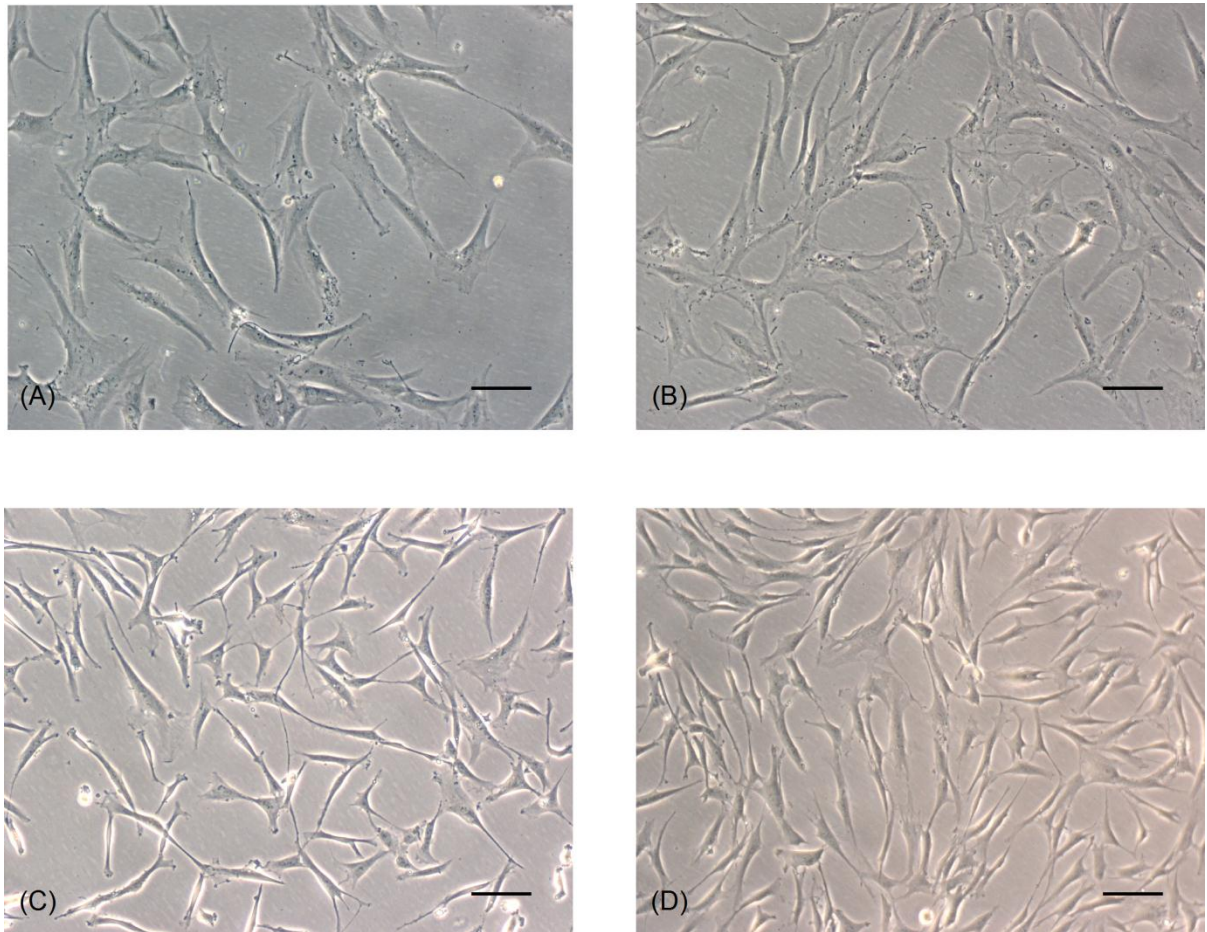


Abb. 14 Kultivierung der hMSC in Monolayer. (A) und (B) zeigen hMSC in P4 ohne Zusatz von FGF-2. Die Zellen sind spindelförmig konfiguriert und gleichmäßig verteilt adhären in der Zellkulturflasche verteilt. (C) und (D) zeigen hMSC in P5 unter Zugabe von 5 ng/ml FGF-2 vor Überführung in die dreidimensionalen Kultursysteme. Die Zellen sind kleiner mit kürzeren Ausläufern und konfluieren rascher als ohne Zugabe von FGF-2. Balken = 100 μ m.

3.3.2 Makroskopische Erscheinung

3.3.2.1 Membrankulturen

Nach 21 Tagen Differenzierung formten sich ähnlich wie in 3.1.2.1 beschrieben hemisphärische Kulturen mit apikaler Kuppe, welche in den Gruppen, in denen Wachstumsfaktoren hinzugefügt worden waren (G1–G3), einen Durchmesser von ca. $7 \times 10^3 \mu\text{m}$ bei einer Auflagefläche von ca. 40 mm^2 erreichten. Unter Zugabe von TGF- β_3 in Kombination mit IGF-1 (G1) oder FGF-2 (G2) erreichten die Membrankulturen eine Höhe von ca. $2 \times 10^3 \mu\text{m}$, während sie unter alleiniger Zugabe von TGF- β_3 (G3) bis $3 \times 10^3 \mu\text{m}$ Höhe erreichen konnten. Membrankulturen der Kontrollgruppe (G4) wiesen nach 21 Tagen einen signifikant geringeren Durchmesser von ca. $2,0 \times 10^3 \mu\text{m}$ und eine signifikant geringere Höhe von ca. $5 \times 10^2 \mu\text{m}$ auf ($p < 0,05$). Membrankulturen der Gruppen G1–G3 zeigten allseits glatte, ebene Oberflächen bei oberflächenmorphologisch und palpatorisch (elastisch-biegsam) hyalinknorpel-typischem Erscheinungsbild. Sie ließen sich problemlos mit chirurgischen und anatomischen Pinzetten gängiger Größen fassen. In der Kontrollgruppe (G4) erwiesen sich die Membrankulturen als nicht-elastisch und nicht-biegsam.

Sie wiesen eine zähvisköse Konsistenz auf. Sämtliche Membrankulturen (G1–G4) ließen sich problemlos mit dem Skalpell von der Zelluloseazetatmembran ablösen bzw. mit der Pinzette abheben ohne die makroskopisch glatte Auflagefläche der Kulturen zu beschädigen.

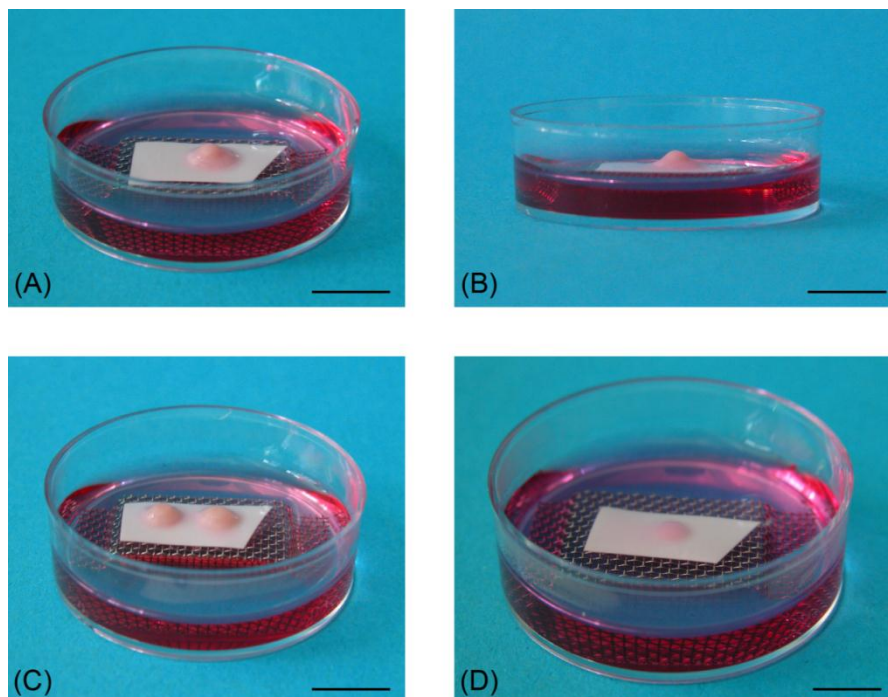


Abb. 15 Makroskopische Erscheinung der Membrankulturen nach chondrogener Differenzierung unter Zugabe von (A) TGF- β_3 +IGF-1 (G1), (B) TGF- β_3 +FGF-2 (G2),

(C) TGF- β_3 (G3) und (D) ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (G4, Kontrolle). Balken = ~ 5 mm.

3.3.2.2 Pelletkulturen

Pelletkulturen der Gruppen G1–G3 formten nach 21 Tagen kugelig-sphäroide, elastisch verformbare Körper mit einem Durchmesser von ca. $1,5\text{--}2,0 \times 10^3 \mu\text{m}$. Pellets der Kontrollgruppe (G4) bildeten ebenfalls Sphäroide aus, jedoch signifikant geringeren Durchmessers ($3\text{--}5 \times 10^2 \mu\text{m}$; $p < 0,05$).

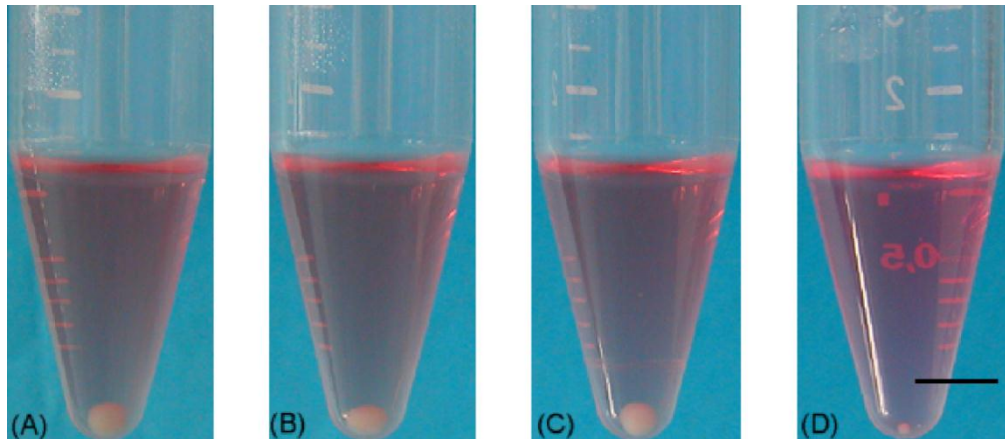


Abb. 16 Makroskopische Erscheinung der Pelletkulturen nach chondrogener Differenzierung unter Zugabe von (A) TGF- β_3 +IGF-1 (G1), (B) TGF- β_3 +FGF-2 (G2), (C) TGF- β_3 (G3) und (D) ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (G4, Kontrolle). Balken = ~ 5 mm.

3.3.3 Histologie und Immunhistologie

3.3.3.1 Membrankulturen

Sämtliche mit Wachstumsfaktoren behandelten Membrankulturen (G1–G3) zeigten eine bis zur 400-fachen Vergrößerung eine lichtmikroskopisch glatte Oberfläche, insbesondere an der ehemaligen Auflagefläche auf der Zelluloseazetatmembran. Sowohl in den histologischen (Toluidinblau und Safranin-O, Abb. 17) als auch in den immunhistochemischen Färbungen für Kollagen Typ II (Abb. 18) fiel bei G1–G3 eine ausgeprägte zonale Verteilung der Membrankulturen auf. Hierbei war ein basaler, an die der Zelluloseazetatmembran zugewandten Fläche angrenzender chondrogener differenzierter Abschnitt mit kräftiger Färbung für Proteoglykane und starkem immunhistochemischem Signal für Kollagen Typ II festzustellen. Diese chondrogene Zone wies in mit TGF- $\beta_3 \pm$ IGF-1 behandelten Gruppen (G1, G3) eine Höhe von ca. $7,0 \times 10^2 \mu\text{m}$ auf und begann unmittelbar basal in dem der Zelluloseazetatmembran aufliegenden Kulturabschnitt. Hingegen begann die chondrogene Zone in den mit TGF- β_3 und FGF-2 behandelten Membrankulturen (G2) bei gleicher Gesamthöhe der Kultur erst mit einem Abstand von ca. $2,0\text{--}7,0 \times 10^2 \mu\text{m}$ von der basalen Auflagefläche und war so von einer Safranin-O-negativen und Kollagen-Typ-II-

schwächeren Schicht von der Auflagefläche auf der Zelluloseazetatmembran getrennt. Bezüglich Uniformität und Intensität der Proteoglykanfärbungen in den chondrogen differenzierten Kulturabschnitten waren die Gewebskonstrukte G2 und G3 den Membrankulturen G1 überlegen, bezüglich der imponierenden EZM wiesen die lediglich mit TGF- β_3 differenzierten Kulturen (G3) mit einem hohen Zellabstand die höchste Qualität auf. Schließlich zeigten die Membrankulturen G2 und G3 eine hyalinem Knorpel nahe kommende, chondroblastäre Zellmorphologie. Sämtliche Membrankulturen der Gruppen G1–3 zeigten oberhalb (apikal) und jeweils lateral (ca. $1,5 \times 10^2 \mu\text{m}$ breiter Saum) dieser chondrogen differenzierten Zone keine Färbung mit Safranin-O und Kollagen-Typ-II (Abb. 17, 18 und 22). Membrankulturen der Gruppe G4 (Kontrolle) ließen sich weder mit Toluidinblau und Safranin-O anfärben, noch zeigten sie ein Signal für Kollagen Typ II.

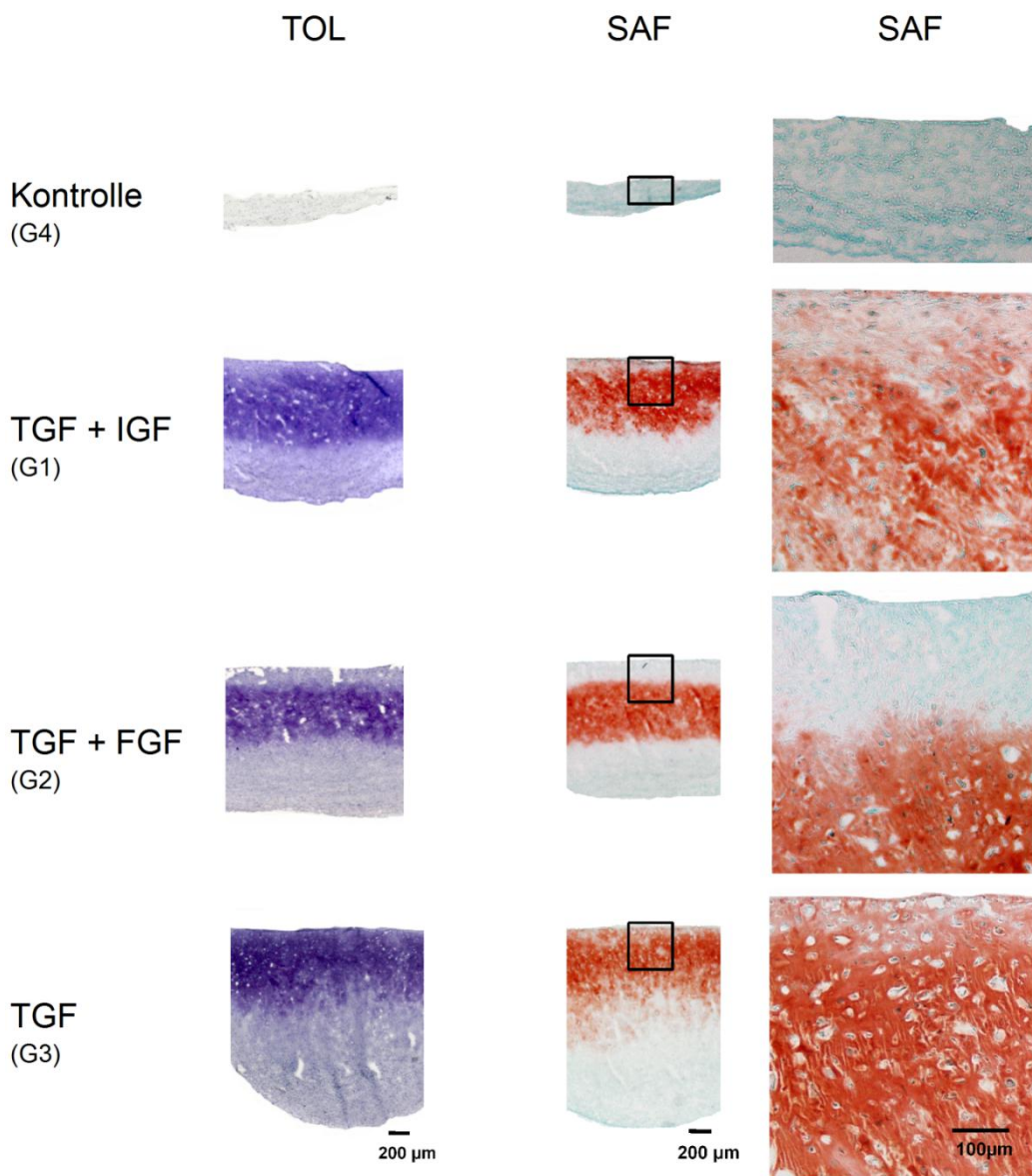


Abb. 17 Histologische Färbungen der chondrogen differenzierten Membrankulturen mit Toluidinblau (TOL) und Safranin-O (SAF). Die Membrankulturen sind dabei um 180° gedreht, d.h. der der Zelluloseazetatmembran aufliegende Abschnitt ist nun apikal dargestellt und beinhaltet in den Gruppen G1 –G3 den effektiv chondrogen differenzierten Kulturabschnitt mit einer

kräftigen metachromatischen Färbung mit Toluidinblau und einer starken Anfärbung durch Safranin-O. Auffallend ist eine nicht-metachromatische und Safranin-O-negative Schicht der Kulturen unter Kombination von TGF- β_3 und FGF-2 (G2) in unmittelbar der Zelluloseazetatmembran aufliegenden, also hier apikalen Kulturschichten. Die mit Safranin-O angefärbten Membrankulturen wurden ferner nach dem Bern-Score ausgewertet (Tab. 14), wobei die lediglich mit TGF- β_3 differenzierte Kultur (G3) den höchsten Punktwert erhielt [178].

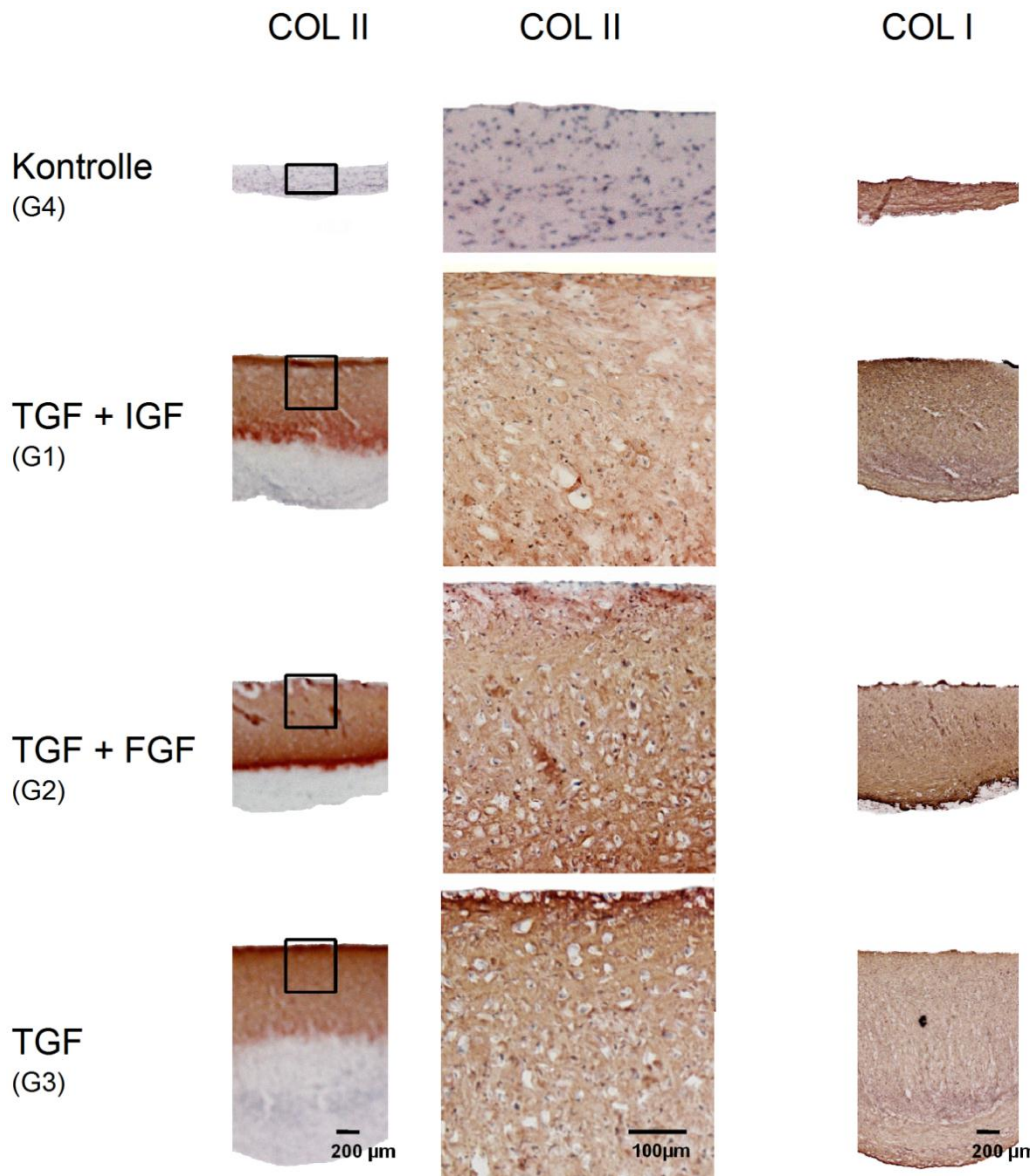


Abb. 18 Immunhistologische Färbungen der chondrogen differenzierten Membrankulturen mit Antikörpern gegen Kollagen Typ II (COL II) und Kollagen Typ I (COL I). Analog zu Abb. 17 sind die Kulturen um 180° gedreht. Es zeigt sich wiederum in den Membrankulturen G1–G3 in der niedrigen Vergrößerung eine effektiv chondrogen differenzierte Schicht mit kräftiger Kollagen-Typ-II-Färbung, die unmittelbar an die Auflagefläche der Zelluloseazetatmembran anliegt (jetzt apikal) und je nach Kultur eine Höhe von $7,0 \times 10^2 \mu\text{m}$ erreichte. War bei Kontrollgruppe (G4) kein Signal für Kollagen Typ II festzustellen, so ließen sich sämtliche Membrankulturen samt Kontrollgruppe (G1–G4) mit einem Antikörper für Kollagen Typ I anfärben, wobei die Färbung in den lediglich mit TGF- β_3 behandelten Kulturen (G3) deutlich schwächer erfolgte als in den anderen (G1, G2, G4) Gruppen [178].

Schließlich zeigten sämtliche Membrankulturen einschließlich der Kontrollgruppe (G1–4) eine gleichmäßig positive Anfärbung mit dem Antikörper für Kollagen Typ I (Abb. 18). Hierbei war bei den lediglich mit TGF- β_3 differenzierten Membrankulturen (G3) die schwächste Färbung festzustellen.

3.3.3.2 Pelletkulturen

Positive Toluidinblau-, Safranin-O- und Kollagen-Typ-II-Färbungen fanden sich in den zentralen Anteilen aller mit Wachstumsfaktoren behandelten Pelletkulturen (G1–3). Die Anwendung von Kombinationen aus Wachstumsfaktoren (G1, G2) ergaben leicht schwächere Färbungen für Safranin-O und Kollagen Typ II mit einem breiteren undifferenzierten Saum um das zentrale chondrogene Zentrum. Die Toluidinblaufärbung war in den Kulturen G1 und G3 am kräftigsten metachromatisch, schwächer in G2. Insgesamt jedoch zeigten sämtliche mit Wachstumsfaktoren behandelte Kulturen eine kräftige Proteoglykananreicherung mit hohem EZM-Anteil und weitem Zellabstand. Letzterer war in den mit lediglich TGF- β_3 differenzierten Kulturen am deutlichsten ausgeprägt (G3). Bei allen Pelletkulturen außer der Kontrollgruppe (G4) zeigte sich außerdem eine ausgeprägte chondroblastäre Zellmorphologie. Der breiteste undifferenzierte Mantel war bei den mit TGF- β_3 und FGF-2 behandelten Pelletkulturen (G2) auszumachen (bis $1,5 \times 10^2 \mu\text{m}$). In der Kontrollgruppe (G4) zeigte sich neben der oben bereits erwähnten reduzierten Größe der Pellets keine positive Färbung für Toluidinblau, Safranin-O und Kollagen Typ II. In allen Versuchsgruppen (G1–G4) der Pelletkulturen war eine uniform-positive Färbung mit Kollagen Typ I festzustellen, welche in den mit TGF- $\beta_3 \pm$ FGF-2 behandelten Kulturen (G2, G3) am schwächsten ausgeprägt erschien.

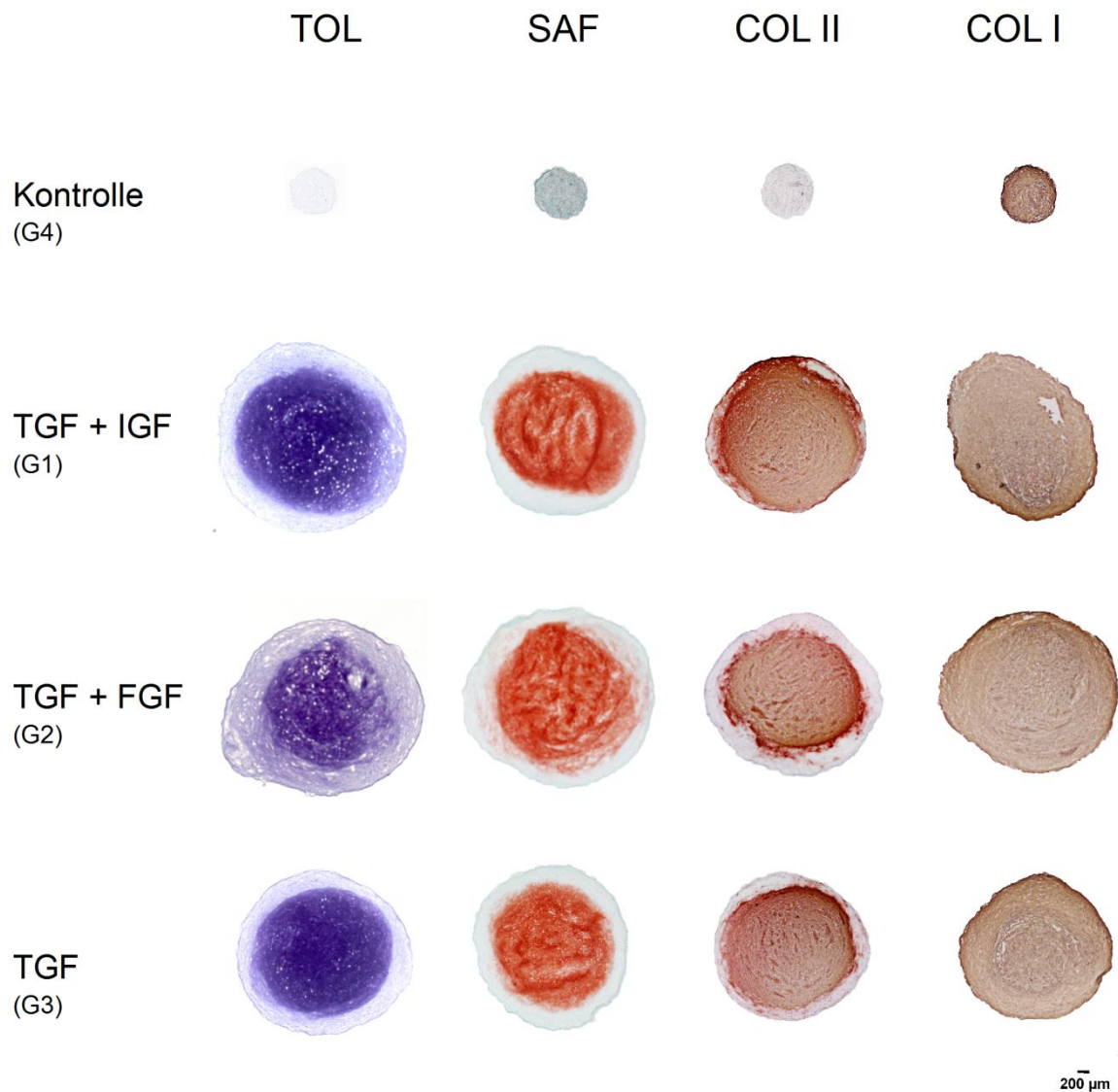


Abb. 19 Pelletkulturen nach histologischer Anfärbung mit Toluidinblau (TOL) und Safranin-O (SAF) sowie immunohistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen Kollagen Typ II (COL II) und Kollagen Typ I (COL I). Sämtliche mit Wachstumsfaktoren behandelten Pelletkulturen färbten sich zentral kräftig für Proteoglykane und Kollagen Typ II an. Neben den in G1–G3 festzustellenden undifferenzierten Säumen, welche in G2 am breitesten ausgeprägt waren, zeigte sich in sämtlichen Pelletkulturen samt Kontrollgruppe (G1–G4) eine uniforme Anfärbung für Kollagen Typ I, in G2 und G3 am schwächsten ausgeprägt. Die mit Safranin-O angefärbten Pellets wurden ferner nach dem Bern-Score ausgewertet, wobei die lediglich mit TGF- β_3 differenzierte Kultur (G3) den höchsten Punktwert erhielt [178].

3.3.3.3 Histologisches Grading nach dem Bern-Score

Tab. 14 bietet einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung der mit Safranin-O gefärbten Membran- und Pelletkulturen der Gruppen G1 –G4 nach dem visuellen histologischen Grading System (Bern-Score).

Wachstumsfaktoren		Kategorie (A)	Kategorie (B)	Kategorie (C)	Total
G1 TGF- β_3 + IGF-1	Membrankultur	2	2	2	6
	Pelletkultur	3	2	2	7
G2 TGF- β_3 + FGF-2	Membrankultur	3	2	3	8
	Pelletkultur	3	2	2	7
G3 TGF- β_3	Membrankultur	3	3	3	9
	Pelletkultur	3	3	2	8
G4 Ø Wachstumsfaktor	Membrankultur	0	2	1	3
	Pelletkultur	0	2	1	3

Tab. 14 Ergebnisse der Auswertungen nach dem Bern-Score in den drei Kategorien Uniformität und Intensität der Safranin-O-Färbung (A), Entfernung der Zellen voneinander / Umfang der EZM (B) sowie Zellmorphologie (C). Die höchsten Punktwerte erhielten sowohl bei den Membran- als auch bei den Pelletkulturen die nur mit TGF- β_3 behandelten Kulturen (G3) mit Punktwerten von 9 bzw. 8.

3.3.4 Expression kartilaginärer Marker

In sämtlichen differenzierten (G1–G3) Membran- und Pelletkulturen fanden sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (G4) eine signifikant höhere Expression von Kollagen Typ II, Aggrekan, COMP und SOX9 als Indikatoren einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung, aber auch eine Expression von Kollagen Typ I und X. Relative Expressionen von Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II fanden sich in sämtlichen differenzierten Pelletkulturen signifikant höher als in den analog behandelten jeweiligen Gruppen (G1–3) der Membrankulturen. Die höchste relative Expression an Aggrekan und COMP fand sich bei den Membrankulturen in der mit TGF- β_3 und IGF-1 behandelten Gruppe (G1) mit signifikanter Erhöhung im Vergleich zu den Gruppen G2 und G3. Bei den Pelletkulturen hingegen wies die Kombination aus TGF- β_3 und FGF-2 (G2) die höchste Aggrekan- und COMP-Expression auf. Die Anwendung von Wachstumsfaktorkombinationen (G1, G2) resultierte in beiden Kultursystemen in einer signifikant höheren Expression des Kollagens Typ II als in den jeweils nur mit TGF- β_3 (G3) behandelten Kulturen.

Die niedrigste Expression des Kollagens Typ X war in den Membrankulturen festzustellen, welche lediglich mit TGF- β_3 differenziert worden waren (G3). Diese und mit TGF- β_3 und IGF-1 behandelte Membrankulturen (G1) wiesen eine im Vergleich zu mit TGF- β_3 und FGF-2 differenzierten Membrankulturen (G2) und allen differenzierten Pelletkulturen (G1–G3) eine signifikant niedrigere Kollagen-Typ-X-Expression auf. Die Kombination aus TGF- β_3 und FGF-2 hatte eine höhere Kollagen-Typ-X-Expression in Membrankulturen (G2) zur Folge als bei sämtlichen differenzierten Pelletkulturen (G1–G3). Die Kombination aus TGF- β_3 und FGF-2 (G2) zeigte in Pelletkulturen eine signifikant erhöhte SOX9-Expression, in Membrankulturen hingegen fand sich die höchste Expression bei den mit TGF- β_3 behandelten Kulturen (G3). Von den Kontrollgruppen abgesehen wiesen mit TGF- β_3 differenzierte Membrankulturen die niedrigsten Kollagen-Typ-I-Expressionen auf, ungeachtet dessen, ob TGF- β_3 mit IGF-1 (G1, G3) kombiniert worden war. Bei den

Pelletkulturen zeigte sich ebenfalls in den mit FGF-2 behandelten Pellets (G2) im Vergleich zu den ohne FGF-2 differenzierten Kulturen (G1, G2) eine wenn auch nicht signifikante höhere Expression des Kollagens Typ I.

Neben einer geringen Kollagen-Typ-I-Expression in der Kontrollgruppe der Pelletkulturen (G4) zeigten diese keine Expression chondrogener Marker. Die Kontrollen der Membrankulturen (G4) hingegen wiesen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren eine wenn auch im Vergleich zu den differenzierten Membrankulturen (G1–G3) signifikant geringere Expression der kartilaginären Marker (außer SOX9) samt Kollagen Typ I und X auf.

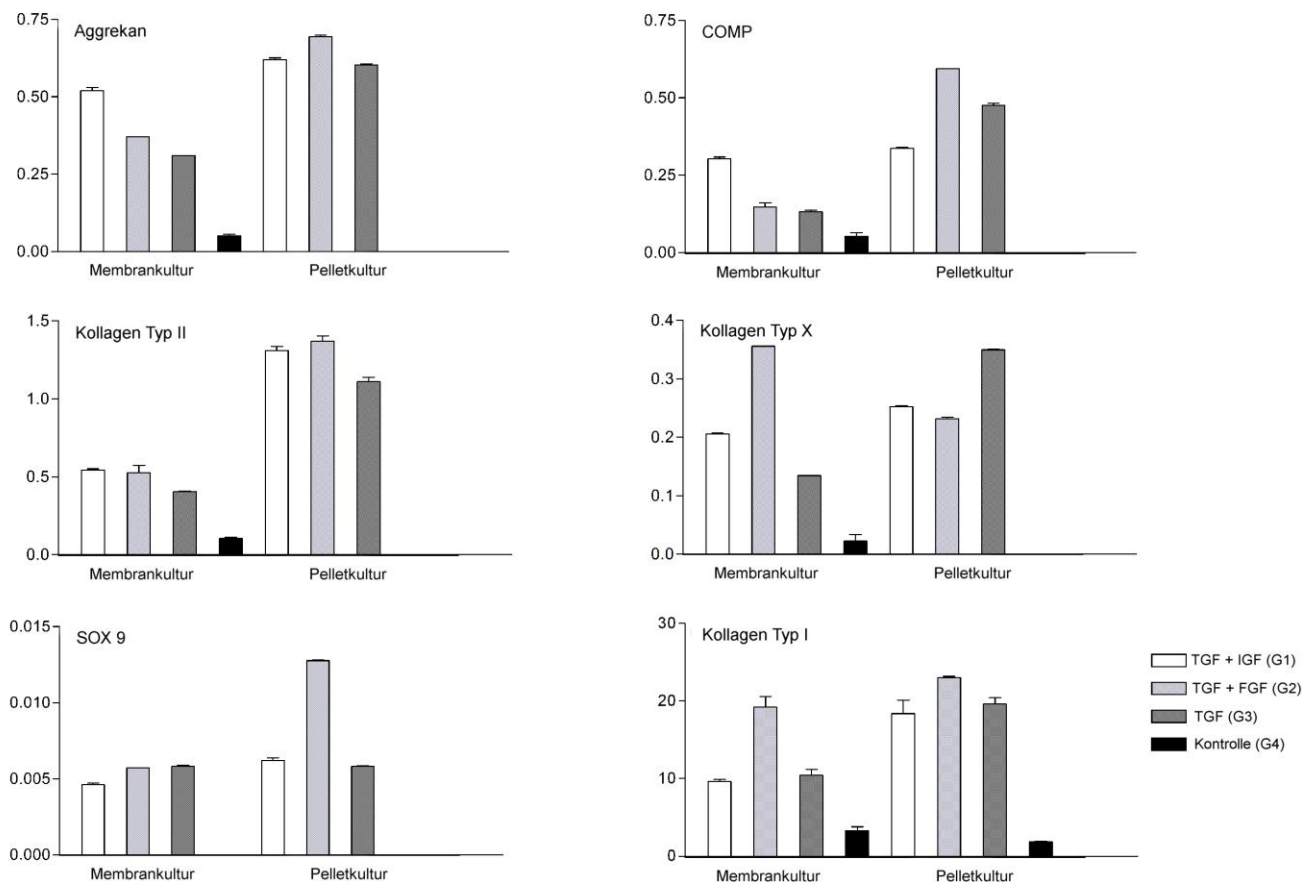


Abb. 20 Ergebnisse der qRT-PCR der Membran- und Pelletkulturen nach erfolgter chondrogener Differenzierung. Die relative Expression ist als mRNA-Quotient aus Zielgen und Cyclophyllin B (Zielgen-mRNA/Cyclophyllin-B-mRNA) dargestellt [178].

3.3.5 Glykosaminoglykangehalt

Der relative Gehalt der Glykosaminoglykane in dreidimensionalen Kultursystemen ist in Abb. 21 dargestellt (GAG/DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{g}$]). Die zuvor ermittelten Standardkurven ergaben bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,999 für den GAG-Gehalt und von 0,998 für den DNA-Gehalt. Sowohl bei

den Membrankulturen als auch bei den Pelletkulturen zeigte sich in allen differenzierten Kulturen (G1–G3) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (G4) ein signifikant höherer GAG/DNA-Gehalt ($p < 0,05$). In mit TGF- β_3 und IGF-1 behandelten Kultursystemen (G1) war der GAG-DNA-Gehalt in den Membrankulturen signifikant höher als in den Pelletkulturen ($p < 0,05$). Der Vergleich der Gruppen G2 (TGF- β_3 + FGF-2) und G3 (TGF- β_3) verhielt sich umgekehrt mit höheren GAG/DNA-Werten in den Pellet-Kulturen ($p < 0,05$). Beim Vergleich der Auswirkung der verschiedenen Kombinationen an Wachstumsfaktoren innerhalb der Kultursysteme fanden sich in den jeweiligen Gruppen (G1–G3) in beiden Kultursystemen ähnliche GAG/DNA-Werte jeweils mit dem höchsten GAG-Gehalt in Membran- und Pelletkulturen unter ausschließlicher TGF- β_3 -Applikation (G3).

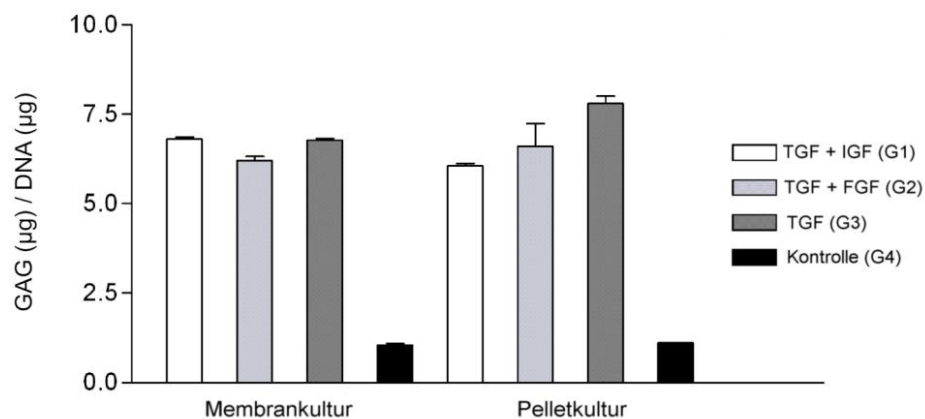


Abb. 21 Relativer Gehalt an Glykosaminoglykanen bezogen auf den Gesamt-DNA-Gehalt in Membran- und Pelletkulturen im DMMB-Bindungsassay [178].

4 Diskussion

4.1 Chondrogenes Potential humaner Chondrozyten in dreidimensionalen Kultursystemen

4.1.1 Isolierung primärer humaner Chondrozyten aus adultem Gelenkknorpel

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, eine effektive und schonende Isolierung der pHC aus humanem Gelenkknorpel zu etablieren [78,186]. Dies konnte anhand der sukzessiven, effektiven Kultivierung der Zellen mit dem Nachweis eines chondrogenen Phänotyps in frühen Passagen und angesichts der Expression von Kollagen Typ II gezeigt werden (Abb. 8 und Abb. 11). Auch die erfolgreiche Generierung von Neoknorpel aus isolierten pHC (s.u.) mittels dreidimensionalen Kultursystemen lässt gerade angesichts auch älterer Gelenkknorpelspender auf eine erfolgreiche Isolierung chondrogener Zellen schließen [111,126].

4.1.2 Dedifferenzierung primärer humaner Chondrozyten in Monolayer-Kultur

Im Rahmen der seriellen Passagierung in Monolayer-Kultur kam es von P0 bis P3 zu einem sukzessiven Verlust der Kollagen- Typ-II-Expression und einem Verlust des chondrogenen Phänotyps in der Zellkultur (Abb. 8 und Abb. 11). Die isolierten Chondrozyten dedifferenzierten ergo innerhalb von vier Passagen (P0–P3) in Monolayer-Kultur, ein in der Literatur bekannter und durch den Verlust der dreidimensionalen Gewebseinbettung (Zell-Zell-, Zell-Matrix-Interaktion) verursachter Effekt [122,123,132].

4.1.3 Kultivierungs- und Redifferenzierungskapazität dreidimensionaler Kultursysteme

Nach Etablierung beider leitschienenfreier dreidimensionaler Kultursysteme war deren Eignung für die Kultivierung von pHC zu evaluieren und deren chondrogenes Potenzial zunächst im Hinblick auf pHC zu vergleichen. Dies erfolgte aus einer seriellen Passagierung der pHC in Monolayer-Kultur mit sukzessiver Überführung der Zellen in die dreidimensionalen Kultursysteme (P1–P5). Hierbei war zunächst festzustellen, dass sowohl die Passage der Zellen (P0–P5), als auch das Kulturmodell und die Dauer der Kultivierung in den dreidimensionalen Kultursystemen (7d vs. 21d) wesentlichen Einfluss auf die Qualität des synthetisierten chondrogenen Gewebes ausübten.

Chondrozytenkulturen, die am Ende von P1 in die Membrankultur überführt worden waren, zeigten nach 7 Tagen Kultivierung scheibenförmige Strukturen mit zentralem Dom, eine histologisch glatte Oberfläche insbesondere an der zur

Zelluloseazetatmembranseite zugewandten Auflagefläche und eine homogene Gewebsstruktur. Das Kulturvolumen der Membran- und Pelletkulturen nahm mit zunehmender Passage sukzessive ab, was durch die abnehmende Fähigkeit der dedifferenzierenden Zellen zur Produktion extrazellulärer Matrix erklärt werden kann. Ferner lösten sich Pellets ab P5 teilweise vollständig auf. Exemplarisch in Abb. 10 dargestellt, zeigten die aus phC früher Passagen (P1) der Monolayer-Kultivierung generierten Membran- und Pelletkulturen eine effektive Generierung von Proteoglykan-haltigen und Kollagen-Typ-II-exprimierenden Knorpelkonstrukten. In den folgenden Passagen nahm analog zur Dedifferenzierung der phC in Monolayer-Kultur die Färbung für Proteoglykane bei insgesamt lockerer Gewebsstruktur und zunehmender Spindelförmigkeit der Zellen im Gewebsverbund mit Verlust des chondrogenen Phänotyps ab. Analog dazu nahm die Expression des Kollagens Typ II sowohl immunhistologisch als auch in der qRT-PCR in beiden dreidimensionalen Kultursystemen allmählich ab und war ab P4 nicht mehr nachweisbar.

Die am Ende von P1 und P2 in die dreidimensionalen Kultursysteme überführten Zellen zeigten höhere Expressionen des Kollagens Typ II als in der jeweils vorangegangenen Monolayer-Kultivierung (Abb. 11). In P3 war außerdem sowohl in den Membran- als auch in den Pelletkulturen eine Kollagen-Typ-II-Expression nachzuweisen, die in der vorangegangenen Monolayer-Kultivierung nicht zu zeigen war. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die von P0 bis P3 dedifferenzierenden phC nach Überführung in die jeweiligen dreidimensionalen Kultursysteme chondrogen redifferenzieren ließen. In P3 führte die Überführung in einen dreidimensionalen Zellverband sogar zur erneuten Expression von Kollagen Typ II. Diese Redifferenzierungskapazität ist für die Membrankultur in aus Alginatkulturen emigrierten phC und für andere Kulturformen hoher Zelldichte bereits gezeigt worden [132,200]. Interessanterweise konnte neben der Redifferenzierungskapazität der Pelletkultur in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kulturform einen Einfluss auf die Qualität der Redifferenzierung nimmt. In P1 zeigte sich bezüglich der Kollagen-Typ-II-Expression für die Membrankultur ein signifikanter Vorteil gegenüber der Pelletkultur, während sich dies in P2 und P3 mit einer signifikant höheren Expression in den redifferenzierten Pelletkulturen umgekehrt verhielt (Abb. 11). Diese Tatsache lässt vermuten, dass phC in ihrem frühen Redifferenzierungsprozess, also auf einer hohen Stufe chondrogener Differenzierung und in dieser niedrigen Passage von einer Kultivierung in der Membrankultur profitieren. Dies unterstützen auch die qualitativ besseren histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse der frühen Passagen der Membrankultur im Vergleich zur Pelletkultur (Abb. 10, (P1)). Das Redifferenzierungspotential der Pelletkultur bot hingegen in den höheren Passagen Vorteile in Hinblick auf Histologie und Immunhistologie (Abb. 10, (P5)). In beiden dreidimensionalen Kultursystemen war diese Redifferenzierungskapazität allerdings durch die sukzessive Passagierung der phC in Monolayer-Kultur limitiert, so dass ab der vierten Passage in Monolayer-Kultur dedifferenzierte phC nicht redifferenziert werden konnten. Ergebnisse von Schulze-Tanzil und Mitarbeitern zeigten eine Redifferenzierungskapazität bis in die vierte Passage bei neun Kultivierungstagen im dreidimensionalen Verbund [132]. Die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass pHc in Membran- und Pelletkulturen nach 21 Tagen unabhängig von der Passage kein Kollagen Typ II bei im Vergleich zur 7-tägigen Kultivierung jeweils geringerer Kulturgröße exprimieren. Dies könnte bei Membrankulturen auf den längeren Kontakt der Kultur mit der umgebenden Atmosphäre und damit den für eine effektive Chondrogenese zu hohen O₂-Gehalt zurückgeführt werden [69,136]. Die 21-tägige Kultivierung von pHc in beiden dreidimensionalen Kultursystemen scheint die Dedifferenzierungsmechanismen nicht inhibieren zu können. Es ist daraus auf eine enge zeitliche Begrenzung der Kultivierung und Redifferenzierbarkeit von pHc in Membran- und Pelletkulturen zu schließen, was insbesondere bei der potentiellen klinischen Anwendung der wesentlich größeren Membrankulturen zu beachten ist (4.3).

4.2 Chondrogenes Potential humaner mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Kultursystemen

4.2.1 Nachweis der Stammzellplastizität

Zunächst wurde der mesenchymale Stammzellcharakter der verwendeten hMSC durch eine erfolgreiche chondrogene, osteogene und adipogene Differenzierung der hMSC *in vitro* nachgewiesen. Der Nachweis einer erfolgreichen Durchführung dieser mesengen Differenzierungsreihe stellt den Goldstandard des Nachweises der mesenchymalen Stammzellplastizität dar [85,201,202]. Neben dieser Differenzierungsreihe weisen außerdem die Plastikadhärenz der Zellen in der Zellkulturflasche und die Expression spezifischer Oberflächenmarker (Tab. 1) auf den Stammzellcharakter hin [85,96]. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnte nach 21 Tagen osteogener Differenzierung der Kalzifizierungsnachweis mittels positiver Von-Kossa-Färbung erbracht werden (Abb. 12). Die Expression des Kollagens Typ I und des Hydroxylapatit-bindenden Proteins Osteopontin unterstützen die Annahme einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung in den mit Differenzierungsmedium behandelten hMSC (Abb.12). Zur osteogenen Differenzierung wurden dem Kulturmedium zusätzlich Glukokortikoide hinzugefügt, da sie in der postnatalen Knochenentwicklung eine entscheidende Rolle in der Knochenformation aus mesenchymalen Stammzellen spielen [189,203,204]. Die erfolgte adipogene Differenzierung wurde durch Nachweis von Neutralfetten intrazellulärer Fettvakuolen mittels Öl-Rot-Färbung und Nachweis der Überexpression des Leptins und des Adipozyten-spezifischen Transkriptionsfaktors PPAR- γ nachgewiesen (Abb. 13) [85,190]. In Zusammenschau der erfolgreichen osteogenen und adipogenen mit einer effektiven chondrogenen Differenzierung (s.u.) wurde der Nachweis der mesenchymalen Stammzellplastizität der verwendeten hMSC geführt.

4.2.2 Präinkubation mit FGF-2

HMSC der vierten Passage vor Überführung in Membran- und Pelletkulturen wurden mit 5 ng/ml FGF-2 behandelt, um deren Proliferation in Monolayer-Kultur in der vierten Passage und das chondrogene Potential im Rahmen der Differenzierung in dreidimensionalen Kultursystemen zu erhöhen [151]. Dabei zeigten hMSC in P5 in Monolayer-Kultur (Abb. 14, (C) und (D)) bei hoher Proliferationsrate die in der Literatur bekannte reduzierte Zellgröße mit kürzeren Ausläufern [205]. Ferner ist von einem weiteren in der Literatur bekannten Effekt einer Präinkubation mit FGF-2 im Rahmen der hMSC-Expansion auszugehen, der allerdings aufgrund einer fehlenden Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit nicht beurteilt werden kann: Solche mit FGF-2 vorbehandelte hMSC generieren chondrogene Pellets, die eine Verringerung des bekannten peripheren, nicht differenzierten Randsaums aufweisen [151].

4.2.3 Einfluss des dreidimensionalen Kultursystems

In sämtlichen dreidimensionalen Kultursystemen, deren Differenzierungsmedium Wachstumsfaktoren der chondrogenen Differenzierung hinzugefügt worden waren, ließ sich eine erfolgreiche Chondrogenese nachweisen. Zum einen erfolgte dies durch histologischen bzw. immunhistochemischen Nachweis von Proteoglykanen bzw. Kollagen Typ II (Abb. 17, 18 und 19), zum anderen durch Nachweis der Expression positiver Marker der Chondrogenese wie SOX9, Aggrekan, COMP sowie Kollagen Typ II (Abb. 20) mittels qRT-PCR [6,98,111]. Auch anhand eines Absorptions- und Fluoreszenzassays wurde die Anreicherung sämtlicher differenzierter Kultursysteme (G1–G3) mit Proteoglykanen nachgewiesen (Abb. 21) [196-198].

Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass unter Zugabe adäquater Wachstumsfaktoren in Membrankulturen kultivierte hMSC zur erfolgreichen chondrogenen *In-vitro*-Differenzierung in der Lage sind. Die entstandenen Gewebskonstrukte ausgehend von 1×10^6 Zellen ergaben nach 21 Tagen Differenzierung flexible scheibenartige Konstrukte mit einer runden, histologisch glatten Basis von durchschnittlich 40 mm^2 (Abb. 15, (A), (B), (C)). Das Volumen eines Kegels als idealisierte geometrische Form der Membrankultur würde bei den durchschnittlich erreichten Ausmaßen der differenzierten Membrankulturen G1, G2 und G3 (Radius, extrapolierte Höhe) ein Volumen von ca. 40 mm^3 ($4,0 \times 10^{10} \text{ } \mu\text{m}^3$) betragen. Differenzierte Membrankulturen (G1–G3) waren histologisch und immunhistochemisch reich an Kollagen Typ II sowie Proteoglykanen und damit extrazellulärer Matrix.

Die Pelletkultur ausgehend von $2,5 \times 10^5$ Zellen als Goldstandard und etablierter Assay zur Evaluation der Chondrogenese *in vitro* beispielsweise im Hinblick auf die Auswirkung von Wachstumsfaktoren wurde in der vorliegenden Arbeit als Referenzmodell verwendet [146,147]. Die Zellzahl in Pelletkulturen in der vorliegenden Arbeit auf 1×10^6 Zellen zur besseren Vergleichbarkeit mit der Membrankultur zu erhöhen, wurde aufgrund vorliegender Studien vorworfen, die

zeigen, dass Pelletsysteme ausgehend von mehr als ca. 5×10^5 Zellen einen erheblichen Abfall der Kollagen-Typ-II-Expression in zentralen Kulturanteilen zeigen [172,206]. So wurden, um bestmögliche Vergleichsbedingungen zu erzielen, Pelletkulturen mit $2,5 \times 10^5$ Zellen angesetzt [178,207]. Auch die chondrogen differenzierten Pellets wiesen eine an Proteoglykanen und Kollagen Typ II reiche EZM auf. Chondrogen differenzierte Pellets (Abb. 16, (A), (B), (C)) wiesen unter der idealisierten Annahme der geometrischen Form einer Kugel mit einem Volumen von etwa 4 mm^3 ($4,0 \times 10^9 \text{ } \mu\text{m}^3$) ca. 10 % des Volumens der differenzierten Membrankulturen auf.

Die relative Expression von Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II (qRT-PCR) zeigte sich in sämtlichen differenzierten Pelletkulturen signifikant höher als in den analog behandelten Membrankulturen (Abb. 20). Dies bestätigte der DMMB-Bindungsassay für die Gruppen G2 und G3 (Abb. 21). Mit Blick auf die effektiv chondrogen differenzierten Anteile in Pellet- und Membrankulturen lässt sich dieses Ergebnis damit erklären, dass in den Membrankulturen (G1–G3) der Anteil histologisch und immunhistochemisch effektiv chondrogen differenzierten Gewebes geringer als in den Pelletkulturen ist (Abb. 17 und 18). Angesichts der höheren Anteile nicht-differenzierten Gewebes der Membrankulturen (G1–G3), welches wie das differenzierte Gewebe Haushaltsgene exprimiert (qRT-PCR) bzw. zum Gesamt-DNA-Gehalt der Kultur beiträgt (DMMB-Bindungsassay), ist die *relativ* niedrigere Expression chondrogener Marker bzw. der *relativ* niedrigere Gehalt an GAG zu erklären. Es ist also die Schlussfolgerung zu ziehen, dass der chondrogen differenzierte Anteil der Membrankulturen (G1–G3) nicht unbedingt weniger Kollagen Typ II oder Proteoglykane enthält wie es die Ergebnisse der qRT-PCR suggerieren. Vielmehr ist der relative Unterschied in der Expression chondrogener Marker bzw. im GAG-Gehalt auf die Normierung auf das Haushaltsgen bzw. den DNA-Gehalt der gesamten Kultur zurückzuführen. Wie bereits erwähnt zeigen Pelletsysteme ausgehend von mehr als ca. 5×10^5 Zellen eine deutlich reduzierte Kollagen-Typ-II-Expression in zentralen Kulturanteilen. Es ist daher davon auszugehen, dass es in Pelletkulturen ausgehend von 1×10^6 Zellen ähnlich wie bei Membrankulturen zur Ausbildung nicht-differenzierter Kulturanteile und damit zu einer deutlich verminderten *relativen* Expression chondrogener Marker gekommen wäre. Insofern werden in der vorliegenden Arbeit den Ergebnissen der chondrogenen Differenzierung in Membrankulturen hohe Maßstäbe in Form von effektiv und annähernd komplett differenzierten, kleineren Pelletkulturen angelegt. Auch das Verhältnis von applizierten Wachstumsfaktoren zur initial eingesetzten Zellzahl spielt hierbei eine Rolle [206]. Betrug das Verhältnis des im Differenzierungsmedium enthaltenen TGF- β_3 in den Pelletkulturen ca. $4,0 \times 10^{-5}$ ng/ml/Zelle, so waren es bei entsprechend größerer Diffusionsstrecke in den Membrankulturen lediglich 10^{-5} ng/ml/Zelle. Dies könnte die Notwendigkeit höherer Konzentrationen von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie deutlich machen, durch welche effektivere Differenzierungen möglich sind [208,209]. Angesichts der hohen Kosten rekombinanter Wachstumsfaktoren stellt dies allerdings ein erhebliches Effizienzproblem gerade auch im Hinblick auf eine klinische Anwendung dar. Ein

Lösungsansatz diesbezüglich wäre die Verwendung autologer, aufbereiteter Wachstumsfaktoren [210]. Histologisch und immunhistochemisch deutete nichts auf einen größeren qualitativen Unterschied zwischen den differenzierten Anteilen beider Kultursysteme hin. Dies wird durch die Ergebnisse des Bern-Scores bestätigt (Tab. 14). Dieser zeigt für die jeweiligen Wachstumsfaktoren bzw. deren Kombinationen maximale Abweichungen eines Score-Werts zwischen Membran- vs. Pelletkulturen von 1 (G1: 6 vs. 7; G2: 8 vs. 7; G3: 9 vs. 8). Hier lässt sich zusammenfassend sagen, dass bezüglich der Qualität der EZM abgebildet durch den Bern-Score innerhalb der differenzierten Kulturabschnitte kein wesentlicher Unterschied festzustellen war. Es zeigte sich die Tendenz dazu, dass in den mit TGF- β_3 +FGF-2 (G2) und mit TGF- β_3 (G3) behandelten Gruppen die höchsten Bern-Score-Werte bei den Membrankulturen zu erheben waren und hier auf die beste in dieser Arbeit erhobenen chondrogenen Qualität hinwiesen.

In der lediglich mit TGF- β_3 behandelten Membrankultur kam es im Vergleich zu sämtlichen Pelletkulturen ferner zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Kollagens Typ X. Diese Reduktion konnte, wenn auch nicht signifikant, für andere leitschienefreie Diffusionskulturen (Transwell-Modell) gezeigt werden [172]. Die Reduktion in Membrankulturen war im Vergleich zu dieser Studie in der vorliegenden Arbeit deutlich effektiver. Dies erlaubt den Schluss, dass das Kulturmodell die chondrozytäre Hypertrophie reduziert und damit ein höheres chondrogenes Potential diesbezüglich aufweist als Pelletkulturen und von anderen Arbeitsgruppen getestete leitschienefreie Kulturmodelle [172].

4.2.4 Einfluss der Wachstumsfaktorkombinationen

Im Hinblick auf die Auswirkung der Applikation von Kombinationen aus Wachstumsfaktoren (G1 (TGF- β_3 +IGF-1); G2 (TGF- β_3 +FGF-2)) auf die Expression des Kollagens Typ II in der Pelletkultur konnten in der vorliegenden Arbeit die Resultate anderer Autoren zunächst bestätigt werden [149,150,205]. Diesbezüglich zeigte sich unter kombinierter Gabe von TGF- β_3 sowohl mit IGF-1 (G1) als auch mit FGF-2 in beiden dreidimensionalen Kultursystemen gegenüber der alleinigen Gabe des TGF- β_3 (G3) in der qRT-PCR eine signifikant höhere Kollagen-Typ-II-Expression. Mit Blick auf die Expression von Aggrecan und COMP konnte unter den Pelletkulturen die Kombination aus TGF- β_3 und FGF-2 (G2) bessere Ergebnisse erzielen, als die Kombination mit IGF-1 (G1) oder die alleinige TGF β_3 -Gabe (G3). Der in der Literatur bekannte additive Effekt der Kombination aus TGF- β_3 und IGF-1 nicht nur in Hinblick auf die Kollagen-Typ-II-Expression, sondern auch auf die Akkumulation von Proteoglykanen und die vermehrte Expression anderer chondrogener Marker konnte zum ersten mal für die Differenzierung in Membrankulturen gezeigt werden. Sowohl bei der Expression des Aggrecans und des COMP, als auch des Kollagens Typ II fanden sich in diesen Membrankulturen der Gruppe G1 die höchsten Werte im Vergleich zu den Gruppen G2 und G3 der Membrankulturen. Dies bestätigt die derzeitige Datenlage zur Kombination von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie mit IGF-1, die einen im Bezug auf die

Akkumulation der EZM, insbesondere der Proteoglykane wie Aggrekan, einen synergistischen Effekt beschreibt [149,150,205]. Dabei binden und regulieren Proteine der Zelloberfläche und solche der EZM (Proteoglykane) die Wirkung des IGF-1 [205], so dass die Art und Qualität des konstruierten bzw. sich differenzierenden Neoknorpels *in vitro* und damit die Kulturform auf die IGF-1-Wirkung Einfluss zu nehmen scheint. Dies könnte die besondere synergistische Wirkung der Wachstumsfaktorkombination TGF- β_3 und IGF-1 (G1) auf die Qualität der generierten Membrankulturen (Steigerung der Expression chondrogener Marker) und den Unterschied in der Wirkung derselben Wachstumsfaktorkombination auf die Pelletkulturen erklären. Diese Beobachtung wird unterstützt durch den signifikant höheren GAG-Gehalt in den Membrankulturen der Gruppe G1 im Vergleich zu den Pelletkulturen derselben Gruppe im DMMB-Bindungsassay (Abb. 21). Bezüglich der lichtmikroskopischen Qualität in der Safranin-O-Färbung (Abb. 17) erzielte allerdings die lediglich mit TGF- β_3 differenzierte Membrankultur (G3) den höchsten Punktwert (9) unter den Membrankulturen im Bern-Score (Tab. 14). Mit einem Punktwert von 8 lag die gleich behandelte Pelletkultur (G3) unter den Pelletkulturen am höchsten und wies damit qualitativ lichtmikroskopisch die beste Qualität auf. Mit Blick auf den Bern-Score ist ferner festzustellen, dass die verschiedenen Wachstumsfaktorkombinationen bei den Membrankulturen (G1: 6; G2: 8; G3: 9) zu größeren Unterschieden führten, als bei den Pelletkulturen (G1: 7; G2: 7; G3: 8) mit einer maximalen Punktwertabweichung von 3 bei den Membrankulturen und 1 bei den Pelletkulturen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der qRT-PCR wider: Bei den unterschiedlich differenzierten Pelletkulturen (G1–3) zeigten sich insgesamt geringere Schwankungen in der Expression von Aggrekan und COMP mit der höchsten Expression bei der Applikation von TGF- β_3 und FGF-2 (G2). Diese Gruppe erzielte bei den Pelletkulturen ferner die höchste Expression des Kollagens Typ II und des Transkriptionsfaktors SOX9. Allerdings zeigten die histologischen und immunhistochemischen Schnitte reproduzierbar einen verbreiterten nicht-differenzierten Mantel um die zentralen chondrogenen Kulturabschnitte (Abb. 19, G2), der auf ein spezifisches peripheres Differenzierungsdefizit hinweisen könnte. Auch wenn die niedrigste Expression des Kollagens Typ X gemessen werden konnte, so zeigten Pelletkulturen dieser Gruppe dennoch die höchste Kollagen-Typ-I-Expression (Abb. 20).

Mittels qRT-PCR war in allen differenzierten Kulturen (G1–3), sowohl Membran- als auch Pelletkultur, eine Expression des Kollagens Typ X als Marker chondrozytärer Hypertrophie zu bemerken. Diese im Hinblick auf die *In-vivo*-Chondrogenese „überschießende“ Differenzierung ist typisch für die *In-Vitro*-Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mittels rekombinanter Wachstumsfaktoren und in sämtlichen Studien, die die Expression des Kollagens Typ X untersuchen, festzustellen. Die Hypertrophierung ist damit ein Hauptproblem der Generierung von Neoknorpel *in vitro* [172,206,211]. *In vivo* wird erst der späte Schritt der chondrozytären Hypertrophie im Rahmen der Chondrogenese von einer Expression des Kollagens Typ X begleitet (Abb. 1). Sie tritt damit signifikant später auf als die Expression des Kollagens Typ II. Im Gegensatz dazu wird bei *in vitro* mit

TGF- β_3 aus hMSC generiertem Neoknorpel das Gen des Kollagens Typ X in der gleichen Phase der chondrogenen Differenzierung exprimiert wie das des Kollagens Typ II [172]. Ein Ziel der weiteren Forschungstätigkeit in diesem Gebiet ist es, zu verhindern, dass die Zellen bzw. der Gewebsverband in seinem Lauf durch die Chondrogenese vor dem Eintritt in die Hypertrophierung stabilisiert werden kann. Das Ziel *in vitro* generierten Neoknorpels muss sein, neben seiner Chondrogenität das Gewebe zwischen Dedifferenzierung und Überdifferenzierung bzw. Hypertrophierung zu stabilisieren [212]. Dies wurde beispielsweise durch die Zugabe von PTHRP (Parathyroid hormone-related peptide) in das Differenzierungsmedium erfolgreich in Agriff genommen [213]. Auch eine Ko-Kultivierung mit phC während der chondrogenen Differenzierung kann zu einer Reduktion der Hypertrophie und damit einer Kollagen-Typ-X-Überexpression führen [214]. In Membrankulturen ist eine Ko-Kultivierung von hMSC und phC prinzipiell möglich und bereits erfolgreich durchgeführt worden [215]. Hier ergeben sich weitere Möglichkeiten, durch Ko-Kultivierung differenzierter und undifferenzierter chondrogener Zellen eine effektive und stabile chondrogene Differenzierung zu erreichen. In lediglich mit TGF- β_3 differenzierten Membrankulturen (G3) konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Kollagen-Typ-X-Expression im Vergleich zu den mit Wachstumsfaktorkombinationen (G1, G2) differenzierten Membrankulturen und sämtlichen Pelletkulturen, also auch der analog behandelten Pelletkultur (G3), nachgewiesen werden. Innerhalb der Pelletkulturen fand sich diese Reduktion der Expression in der Gruppe G3 hingegen nicht. Dies könnte als Hinweis auf die Fähigkeit speziell der Membrankultur zur deutlichen Reduzierung der Hypertrophierung des generierten Neoknorpels und damit dessen Stabilisierung in gerade dem gewünschten chondrogenen Stadium gedeutet werden, insbesondere unter der alleinigen Zugabe von TGF- β_3 im Differenzierungsmedium. TGF- β spielt in der Chondrogenese gemeinsam mit einigen BMP-Proteinen (TGF-Superfamilie) eine zentrale Rolle. Von den Isoformen TGF- β_2 und TGF- β_3 konnte gegenüber der Isoform TGF- β_1 gezeigt werden, dass eine effektivere *In-Vitro*-Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen induziert wird [148], so dass die rekombinante Isoform TGF- β_3 in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Ferner ist gezeigt worden, dass TGF- β_3 effektiv die Expression von Kollagen Typ X in Chondrozyten explantierten Gelenknorpels zu supprimieren in der Lage ist, was die vorliegenden Ergebnisse der Kollagen-Typ-X-Expression in der Membrankultur unterstützt.

Ein auch für diese Stabilisierung des chondrogenen Phänotyps essenzieller Transkriptionsfaktor ist SOX9 (Abb. 1). Die Reduktion der Kollagen-Typ-X-Expression der nur mit TGF- β_3 behandelten Membrankulturen (G3) ging mit einer erhöhten SOX9-Expression einher. Es ist bekannt, dass die Expression des SOX9-Gens die Expression von Kollagen Typ X supprimiert und so eine zelluläre Hypertrophie verhindert [216]. Eine signifikant erhöhte SOX9-Expression fand sich in der Pelletkultur in den mit TGF- β_3 und FGF-2 behandelten Kulturen (G2). SOX9 reguliert im positiven Sinn die Genexpression des Kollagens Typ II und der Proteoglykane. Diesbezüglich fand sich bei den Membrankulturen der Gruppe G3 der höchste Punkt-Wert (9) im Bern-Score (Tab. 14), wobei diese Gruppe die höchste

SOX9-Expression unter den Membrankulturen aufwies (Abb. 19). Dies impliziert wiederum eine effektive Chondrogenese gemeinsam mit reduzierter Hypertrophie in dieser Gruppe der Membrankulturen. Die Ergebnisse der SOX9- und Kollagen-Typ-X-Expression der lediglich mit TGF- β_3 behandelten Membrankulturen (Abb. 20) könnten das beste Bern-Score-Ergebnis dieser Gruppe unter allen Membrankulturen trotz der im Vergleich zu den Wachstumsfaktorkombinationsgruppen (G2, G3) reduzierten Expression von Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II erklären (Abb. 15 und 20). Ferner exprimierten sämtliche Membrankulturen (insbesondere G1 und G3) weniger Kollagen Typ I als die jeweiligen Pelletkulturen, obwohl geringere Anteile der Membrankulturen effektiv chondrogen differenziert waren (4.2.3). Kollagen Typ I weist als charakteristisches Kollagen des Faserknorpels auf einen sowohl biochemisch als auch mechanisch im Bezug auf hyalinen Gelenknorpel minderwertigen Knorpel hin [111]. Diese Ergebnisse unterstützen weiterhin die Hypothese, dass die Expression unspezifischer Gewebsmarker in der Membrankultur supprimiert wird und unterstreicht in diesem Sinne die potentielle Chondrogenität der Kultur. Sie weisen wiederum daraufhin, dass diese Chondrogenität durch die alleinige Applikation des TGF- β_3 als Wachstumsfaktor (G3) bestmöglich genutzt werden kann. Andere Arbeitsgruppen prüfen diesbezüglich die Auswirkungen der sequentiellen Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren im Sinne eines Mehrschritt-Differenzierungsprotokolls auf die Expression kartilaginärer Marker [217]. Pelletkulturen hingegen zeigten die besten Ergebnisse, wenn sie mit TGF- β_3 und FGF-2 in Kombination (G2) differenziert wurden. Hier fand sich neben einem hohen Wert im Bern-Score (7) unter den Pelletkulturen die höchste Expression für Aggrekan, COMP, Kollagen Typ II und SOX9 sowie die niedrigste Expression an Kollagen Typ X. Allerdings zeigten solche Pellets einen nicht-differenzierten Randsaum größeren Ausmaßes (bis $1,5 \times 10^2 \mu\text{m}$) und die höchste Expression des Kollagens Typ I.

Interessanterweise fand sich in der Kontrollgruppe der Membrankultur (G4) eine – wenn auch geringe – Expression von Aggrekan, COMP, Kollagen Typ I, II und X. Eine SOX9-Expression war nicht detektierbar. Histologisch und immunhistochemisch waren keine chondrogen differenzierten Areale abgrenzbar. Es kann aber angenommen werden, dass geringe Anteile der Membrankultur der Kontrollgruppe spontan chondrogen differenziert sind. Dies könnte durch die Präinkubation mit FGF-2 gebahnt worden sein. Allerdings weist die Tatsache, dass ebenfalls mit FGF-2 präinkubierte hMSC der Kontrollgruppe der Pelletkultur keine Expression chondrogener Marker aufwiesen (lediglich eine Expression des unspezifischen Kollagens Typ I), daraufhin, dass der Unterschied zwischen der Expression der chondrogenen Marker auf die Kulturform zurückgeführt werden kann. Die Chondrogenität der Membrankultur könnte hier zur spontanen chondrogenen Differenzierung von hMSC ohne Zugabe rekombinanter Wachstumsfaktoren geführt haben. Durch welche potentiell chondrogenen Faktoren sich in die Membrankultur im Speziellen auszeichnet, wird im folgenden Abschnitt 4.3 erörtert.

4.3 Chondrogenität der Membrankultur

Es konnte zunächst bestätigt werden, dass Membrankulturen sowohl zur Kultivierung als auch zur Redifferenzierung humaner Chondrozyten geeignet sind [132]. Zum ersten Mal konnte ferner gezeigt werden, dass die Membrankultur für eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung von hMSC *in vitro* geeignet ist und als entsprechendes Modell verwendet werden kann. Interessanterweise exprimierten Membrankulturen der Kontrollgruppe (G4), die keinen Wachstumsfaktoren ausgesetzt waren, im Gegensatz zu den Pelletkulturen der Kontrollgruppe Aggrekan, COMP sowie Kollagen Typ I, II und X. Bei der Aggrekan- und COMP-Expression der Kontrollgruppe der Membrankulturen (Abb. 20) lagen die relativen Werte im Bereich von in der Literatur beschriebenen mit TGF- β_3 differenzierten Pelletkulturen [172]. Hier war es also zu einer spontanen wachstumsfaktorunabhängigen chondrogenen Differenzierung der hMSC in Membrankulturen gekommen, die auf ein besonderes chondrogenes Potential dieser Kulturform hinweist.

4.3.1 Dreidimensionalität, hohe initiale Zelldichte und Mikromilieu

Unter den chondrogen wirkenden Faktoren wäre zunächst die Dreidimensionalität der Kultur zu nennen, die einen Zellverband ermöglicht, der durch die Ausbildung zahlreicher Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte gekennzeichnet ist. Eine hohe initiale Zelldichte simuliert die Kondensationsphase der frühen *In-vivo*-Chondrogenese und führt *in vitro* zu vermehrter Matrix-Produktion [7,132,174,175]. Hierbei spielen für die Initiation der Differenzierung die Ausbildung von Gap-Junctions sowie auto- und parakrine Faktoren (Zytokine, Chemokine) eine entscheidende Rolle [7,9,173]. Die Membrankultur kann hierbei ein chondrogenes Milieu schaffen, das unter alleiniger Gabe von TGF- β_3 am effektivsten zur Chondrogenese geeignet zu sein scheint (4.2.4). Die Entstehung dieses chondrogenen Mikromilieus wird entscheidend durch das Fehlen einer Verdünnung solcher chondrogener Faktoren durch Kulturmedium wie etwa in Monolayer-Kultur oder in anderen, insbesondere flottierenden Kulturformen wie der Pelletkultur begünstigt [22,172,173]. Leitschienefreie Kulturen mit hoher Zelldichte („High-density-Kulturen“), worunter auch die Pelletkultur subsumiert werden kann, haben bereits in verschiedensten Ausführungen gute Ergebnisse im Bereich der Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen *in vitro* gezeigt [132,146,172,200,218]. Auch für humane Chondrozyten ist eine effektive Proliferation ohne den für die Monolayer-Kultivierung typischen Verlust des chondrogenen Phänotyps in dreidimensionaler Umgebung beschrieben [122,219]. Dies wurde für die Pelletkultur [135,220] wie für die Membrankultur bereits gezeigt [132]. So ist die Membrankultur in der Lage die *In-vivo*-Bedingungen der initialen Schritte der Chondrogenese für kultivierte, insbesondere aber für chondrogen differenzierende Zellen zur Verfügung zu stellen.

4.3.2 Zelluloseazetatmembran und Ernährung durch Diffusion

Zu den spezifischen Eigenschaften der Membrankultur, Einfluss auf die Chondrogenese nehmen zu können, gehört auch das unterliegende Substrat in Form der Zelluloseazetatmembran [22,173,178]. Bei den Membrankulturen wurde ein ca. 1×10^6 Zellen enthaltendes Pellet auf die auf dem Stahlbrückchen liegenden Zelluloseazetatmembran pipettiert, so dass es zum unmittelbaren Kontakt der untersten Zellschicht des Pellets und damit des späteren Neoknorpels mit der $0,2 \mu\text{m}$ weiten Membran kommt (Abb. 6 und 15). Die Ergebnisse der Membrankulturen, in denen hMSC chondrogen differenziert wurden, zeigen dabei eine lichtmikroskopisch glatte und intakte Oberfläche an der zur Zelluloseazetatmembran gelegenen Seite. In diesem Bereich bildete sich auch die effektiv chondrogen differenzierte Zone bzw. der chondrogene Anteil der Membrankulturen aus (Abb. 17 und 18). Dies könnte zum einen durch die Diffusionsstrecke von Medium und den darin enthaltenen chondrogenen Faktoren liegen, die in den an die Membran angrenzenden Abschnitten in besonders hoher Konzentration vorgelegen haben dürften, zum anderen könnte die Zelluloseazetatmembran selbst bzw. die die Auflage auf dieser chondroinduktiv wirken. Von Substraten als unterliegendem Sockel bzw. Zellunterlage für Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, die Chondrogenese *in vitro* zu verbessern [129]. Des Weiteren spielt neben der Zusammensetzung der EZM ebenfalls die Elastizität der Zellunterlage eine entscheidende Rolle für die Differenzierungseigenschaften mesenchymaler Stammzellen [176]. Durch Matrixsteifigkeit und der an der Membran stattfindenden Zelladhäsion kann ferner eine Regulierung der Chondrogenese erfolgen [6,177]. Interessanterweise können Art und Ausmaß der Zelladhäsion dabei auf die Expression des Kollagens Typ X Einfluss nehmen. Diese zeigte sich im Vergleich zur analog behandelten Pelletkultur in mit TGF- β_3 (G3) differenzierten Membrankulturen signifikant erniedrigt (Abb. 21). Adhäsionsmechanismen und Matrixsteifigkeit könnten hierzu beigetragen haben. Ein weiterer Vorteil der Auflage der Kultur auf der Zelluloseazetatmembran ist die nach der einfachen und problemlosen Entfernung entstehende, histologisch glatte Oberfläche an der Basis der Kultur. Diese könnte für den *In-vivo*-Einsatz um 180° gedreht werden (Abb. 17, 18 und 22), wodurch eine zum Gelenkspalt weisende, artefizielle Facies articularis geschaffen werden könnte (Abb. 22). Für auf Zelluloseazetatmembranen transferierte Zellen konnte im Rahmen der im Bereich der Ophthalmologie angewandten Impressionszytologie trotz Nachweises einer festen Haftung der Zellen am Filter elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass durch den Transfer bzw. das Ablösen der Zellen von der Membran eine Zellruptur nicht zu erwarten ist [221]. Dies lässt sich auf die Membrankultur übertragen. So ist davon auszugehen, dass die glatte Oberfläche der Membrankulturen nicht nur wesentlich der festen Auflage des Gewebes auf der Zelluloseazetatmembran zu verdanken ist, sondern dass das Ablösen der Membrankultur von der Filtermembran am Ende der *In-vitro*-Kultivierung von intakten Zell- und Gewebsstrukturen in diesem basalen, chondrogenen Bereich begleitet ist. Dies bestätigte sich histologisch (Abb. 17, 18 und 22) bei bis zu 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Ob die Oberfläche der Membrankulturen auch

elektronenmikroskopisch glatt und intakt ist, konnte aufgrund des knappen Probenmaterials nicht spezifisch untersucht werden. Die Generierung von Neoknorpel auf chondroinduktiven Substraten stellt so einen potentiellen Vorteil gegenüber der Zelldistribution in einer Leitschiene und einen weiteren Vorteil gegenüber in flüssigem Medium flottierenden Kulturen wie der Pelletkultur dar.

Der zweite der Membran zuzurechnende Vorteil ist die Nutrition der Kultur per diffusionem, welche nicht nur die *In-vivo*-Bedingungen unreifen und reifen Knorpels nachahmt [32,56], sondern auch für ein adäquates Zell-Medium-Verhältnis sorgt, das für eine effektive Chondrogenese *in vitro* erforderlich ist [166,173]. Dabei wurde die maximale Diffusionsstrecke von 3 mm durch die Höhe der sowohl bei der Kultivierung von phC als auch der Differenzierung von hMSC generierten Membrankulturen (maximal je ca. $3 \times 10^3 \mu\text{m}$) nicht überschritten, so dass das Diffusionsprinzip als natürlicher Faktor für die Membrankultur nicht nur als geeignet bezeichnet werden kann, sondern auch als chondrogen.

Analog zu dem nicht-differenzierten Mantel um Pelletkulturen, die mit TGF- β_3 und FGF-2 differenziert wurden (G2), bildeten die Membrankulturen derselben Gruppe eine Proteoglykan-negative sowie Kollagen-Typ-II-schwächere Schicht mit einem Abstand von ca. $2,0 - 7,0 \times 10^2 \mu\text{m}$ von der basalen Auflagefläche aus (Abb. 17 und 18, G2). Die Ursache dieses Effekts bei zusätzlich mit FGF-2 behandelten Membrankulturen bleibt Spekulation. Möglich wären Diffusionsphänomene im Bezug auf das Protein FGF-2, Eigenschaften der Zelluloseazetatmembran (Ladung, Adsorption) oder Bindungsphänomene der Matrix in äußeren Kulturbereichen. Diese möglichen Phänomene legen ebenfalls die Empfehlung nahe, TGF- β_3 nicht mit FGF-2 bei der Differenzierung von hMSC in Membrankulturen einzusetzen.

4.3.3 O₂-Gehalt und Kontakt zur Atmosphäre

Ursprünglich war das Nutritionsprinzip der Membrankultur („Organoidkultur“) für die Kultivierung fetaler Gewebe und Organe genutzt worden [173,180], um Fragen der Entwicklung und Teratogenese durch *In-vitro*-Studien beantworten zu können. Dabei aufgetretene, zentrale Nekrosen wurden hypoxischen Bedingungen (niedriger O₂-Gehalt) im Zentrum des untersuchten Embryonalgewebes zugeschrieben [180]. Die hypoxischen Bedingungen in zentralen Anteilen der Membrankultur als weiteres spezifisches, chondrogenes Charakteristikum sind im Wesentlichen verursacht durch die niedrige Sauerstofflöslichkeit [178]. Die Zelluloseazetatmembran als Zell- bzw. Gewebsunterlage ist ferner gekennzeichnet durch eine niedrige Gasdurchlässigkeit für O₂ [184]. Die im Zentrum der Membrankulturen herrschenden hypoxischen Bedingungen sind hingegen für eine effektive *In-vitro*-Chondrogenese förderlich, da für sie analog zu den *In-vivo*-Bedingungen nachgewiesen wurde, die Chondrogenese zu begünstigen [68,156,157,222]. Auch in reifem Gelenkknorpel beträgt der O₂-Gehalt lediglich 2–6 % [223]. Es ist davon auszugehen, dass die zentralen hypoxischen Bedingungen der Membrankultur die Chondrogenese in der vorliegenden Arbeit verbessert haben. Hypoxische Expansion von hMSC fördert ebenfalls die chondrogene Differenzierung *in vitro* [224]. Die Eigenschaften

mesenchymaler Stammzellen und ihrer „Nische“ („*microenvironment*“) werden ferner sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entscheidend durch den O₂-Gehalt beeinflusst, *in vitro* insbesondere in dreidimensionaler Umgebung. Dabei sind die Umweltbedingungen im Knochenmark mit einem O₂-Gehalt von 2 % ebenfalls als hypoxisch zu bezeichnen [225]. Sauerstoff fungiert in diesem Sinne als Signalmolekül und so als entscheidender Faktor der Stammzellregulierung [225].

Daraus und aus der Tatsache, dass in den meisten Embryonen der Säugetiere und damit im Rahmen der Chondrogenese der O₂-Gehalt im Bereich von 2–8 % liegt, ist zu schließen, dass die die Membrankulturen umgebenden 21 % O₂-Gehalt prinzipiell als unphysiologisch anzusehen sind [225]. Ein Problem der Membrankultur, das mit dieser Tatsache in Verbindung gebracht wird, stellt die Kultivierung an der Grenze Atmosphäre zu Medium sowie der Kontakt von äußeren (apikalen und lateralen) Anteilen mit Atmosphäre dar. Hiermit könnten die wesentlich schlechteren Ergebnisse der 21-tägigen Kultivierung von pH_C in Membrankulturen gegenüber der 7-tägigen begründet werden (3.1.2). Auch die Tatsache, dass gerade die lateroapikalen Anteile der mit Wachstumsfaktoren behandelten Membrankulturen aus hMSC (Abb. 17 und 18), welche während der 21-tägigen Differenzierung Kontakt zur Atmosphäre hatten, nicht effektiv chondrogen differenziert waren, könnte durch die Inhibition der Chondrogenese durch den hohen angrenzenden, unphysiologischen O₂-Gehalt von 21 % erklärt werden. Imitiert also das Zentrum der Membrankultur die begünstigenden hypoxischen Bedingungen der In-vivo-Chondrogenese und bietet dabei auch für hMSC chondroinduktive Bedingungen, so steht diesem ein äußerer oxygenierter latero-apikaler Gewebsmantel gegenüber, dessen Bedingungen (Oxygenierung, Diffusionsstrecke) der Chondrogenese weniger förderlich sind [156,157]. Der Verlust chondrogener Phänotypie bzw. die mangelnde chondrogene Differenzierung in den lateroapikalen Anteilen der Membrankulturen könnte ferner durch die erhöhte Diffusionsstrecke und die aufgrund der hemisphärischen Kulturform herrschenden Zugkräfte erklärt werden. Letztere würden im Gegensatz zu Diffusionsstrecke und O₂-Toxizität auch den (histologisch und immunhistochemisch) fehlenden bzw. schwächeren Nachweis von Proteoglykanen und Kollagen Typ II in einem nicht-differenzierten Saum in Membran- und Pelletkulturen erklären. Dieser nahm mikroskopisch in den mit TGF-β₃ und FGF (G2) behandelten Membrankulturen (basal) und Pelletkulturen (peripherer Saum) deutlich breitere Ausmaße an als in den ohne FGF-2 differenzierten Kulturen (G1, G3). Würde also die O₂-Toxizität die ausbleibende Differenzierung in den an die Atmosphäre angrenzenden Kulturanteilen erklären, so könnte die basoapikale Diffusionsstrecke die Diffusionskapazität der Wachstumsfaktoren überschreiten und so die basoapikale-zonale Distribution differenzierter bzw. nicht-differenzierter Kulturanteile erklären. Einige Arbeitsgruppen konnten bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen unter 5%igem O₂-Gehalt der Atmosphäre eine verbesserte chondrogenen Phänotyp und eine erhöhte Expression kartilaginärer Marker nachweisen [226]. Andere Autoren erreichten hingegen durch diese Maßnahme in leitschienenfreien Diffusionskulturen (Transwell-Modell) keine weitere Effektivierung der Chondrogenese [172]. Hier scheint die Eignung jeder individuellen Kulturform bezüglich erniedrigten O₂-Gehalts auf den

Prüfstand zu müssen. Weitere Studien zur Membrankultur könnten klären, inwieweit ein reduzierter O₂-Gehalt (5%) der angrenzenden Atmosphäre die Qualität des Neoknorpels verbessert, inwieweit die ineffektive bzw. reduzierte chondrogene Differenzierung der lateroapikalen Gewebsanteile der Membrankultur verhindert werden kann und wie groß der Anteil der Diffusionsproblematik insbesondere in Hinblick auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren wäre.

Die Ergebnisse der 21-tägigen Kultivierung von phC in Membrankultur legen den Schluss nahe, dass diese Kulturform für eine Langzeitkultivierung von phC, insbesondere mit 21 % O₂-Gehalt der Atmosphäre, weniger geeignet ist. Eine Folge der eingeschränkten Langzeitkultivierung wäre in diesem Falle, dass ein Gelenkknorpeldefekt gedeckt werden sollte, sobald eine oder mehrere der gezüchteten Kulturen das Volumen des Defekts auszufüllen im Stande wären [199]. Gegenüber einer 7-tägigen Kultivierung von primären Chondrozyten ist zur suffizienten chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aufgrund der Stimulationsbedürftigkeit durch Wachstumsfaktoren ein Zeitraum von 21 Tagen Standard. Hier wäre es interessant, welche Ergebnisse eine 14-tägige und eine 28-tägige Differenzierung erbrächten.

4.3.4 Leitschienenfreie Kultivierung und Differenzierung

Vorteile einer leitschienenfreien Kultivierung und Differenzierung chondrogener Zellen zur Generierung von Neoknorpel bestehen neben den reduzierten Kosten und der Herstellung der teilweise aufwendig zu fabrizierenden Leitschienen im besonderen im Vermeiden der mit Leitschienen bzw. Scaffolds verbundenen Nachteile, Probleme und Risiken. Leitschienen sind in der Lage, durch dreidimensionale Kulturbedingungen, Zell-Matrix-Interaktion und die Applikation chondrogener Faktoren Vorteile zu bieten. Diesen stehen Nachteile (1.3.4) wie inhomogene Zellverteilung in der Leitschiene, Inhibierung der EZM-Deposition, Beeinflussung der Zellfunktion über Interaktionen zwischen Zelle und Leitschiene, Toxizität (Biokompatibilität), Fremdkörperreaktionen, Immunogenität, Infektiosität, mechanische Instabilität, Schrumpfung und enzymatische Degradation mit intrakartilaginärem Anfall von Abfallprodukten, inkomplette Integration in den Knorpeldefekt mit potentiell insuffizienter Verbindung des generierten Neoknorpels mit dem nativen Knorpel und Chondrolyse entgegen [111,165,166,172,227]. Zwar können mit Wachstumsfaktoren beschichtete Leitschienen zu einer Steigerung des chondrogenen Potentials der generierten Konstrukte beitragen, was in leitschienenfreien Modellen unmöglich ist, allerdings sind auch hier mit der Beschichtung potentielle Nachteile und *in vivo* unerwünschte Transplantatwirkungen verbunden. Beispielsweise liegen mit TGF-β₃ beschichtete Leitschienen mit ihren Dosen im Bereich von 50 bis 250 ng [155]. Höhere Dosen können dabei mit Pannusformation, Knorpelerosion, Synovitis und Gelenkergüssen assoziiert sein [155]. Insbesondere Fremdkörperreaktionen zu verhindern, ist ein Hauptziel des Einsatzes leitschienenfreier Knorpelkonstrukte [228]. Die Verwendung von Membranbasierten Diffusionskulturen zur leitschienenfreien Kultivierung und Differenzierung

chondrogener Zellen *in vitro* stellt einen effektiven Lösungsansatz dar [172,229]. Die Nutzung der Membrankultur zur Gewinnung chondrogener Konstrukte sowohl aus Chondrozyten wie auch aus Stammzellen ist, wie es in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, möglich. Membrankulturen könnten dabei gerade angesichts ihrer Größe eine Alternative zur Verwendung von Leitschienen, welche ja auch aufgrund ihres Ausmaßes zur Deckung von Knorpeldefekten geeignet sind, darstellen, um implantierbaren Neoknorpel zu generieren und damit auch klinisch einsetzbar zu sein (4.3.5).

4.3.5 Größe und Möglichkeit der Implantation

Auch wenn das Pelletkulturmodell eine effektive Chondrogenese zu gewährleisten in der Lage ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, so ergeben sich dennoch Probleme. Unter diesen sind ihre Größe von ca. 2–3 mm maximalen Durchmessers, ihre geometrische Form, welche einer optimalen Rekonstruktion einer ebenen, glatten Gelenkfläche entgegensteht sowie die schwierige Einnah- bzw. Implantationstechnik einzelner Pellets zu nennen. Nichts desto trotz findet die Implantation von derartig *in vitro* generierten Zellpellets bereits zugelassene klinische Anwendung (Chondrosphere[®], Co.Don AG, Teltow, D), auch wenn die hierfür benötigten Zellzahlen sehr hoch sind, um fokale Gelenkknorpeldefekte üblicher Größe decken zu können [230].

Die weitere Erprobung größerer leitschienenfreier Gewebstrukture wie der Membrankultur mit glatter, intakter Oberfläche könnte verbesserte Ergebnisse in der klinischen Anwendung zeigen. Unter diesem Gesichtspunkt könnten die leitschienenfreien, geometrisch günstigeren, nämlich scheibenförmigen, größeren Membrankulturen mit glatter Oberfläche bezüglich der Implantation und damit einer klinischen Anwendung gegenüber Pelletkulturen mit ihrer Limitation in Größe und Form als Standardmodell von Vorteil sein. Bei einer Auflagefläche von ca. 40 mm² (3.3.2.1) könnten aus 10⁷ hMSC generierte Membrankulturen Knorpeldefekte von ca. 4 cm² (4 x 10² mm²) Fläche decken. Eine mögliche Implantationstechnik wäre nach Entfernung der Kultur von der Zelluloseazetatmembran und Wenden um 180° (Abb. 17, 18 und 22) die Einnah bzw. das Einkleben in Analogie zur matrix-gestützten ACT (MACI) in den debridierten Gelenkdefekt. Würden Gewebstrukture aus Membrankulturen den *In-vitro*-Ergebnissen ähnliche *In-vivo*-Resultate ergeben, wären sie als leitschienenfreie Konstrukte aufgrund ihres guten chondrogenen Potentials und der aus ihnen generierten großen Gewebstrukture eine interessante Alternative zu etablierten Verfahren wie der MACI. Zunächst wären weitere Studien erforderlich, um die Vitalität der *in vitro* generierten Gewebstrukture aus der Membrankultur *in vivo* zu prüfen und die Frage zu klären, ob sowohl pHc als auch chondrogen differenzierte hMSC *in vivo* ihr chondrogenes Potenzial aufrechterhalten können. Des Weiteren wäre zu zeigen, ob die erfolgreiche Deckung eines Gelenkknorpeldefekts *in vivo* durch die Implantation durch Membrankulturen generierten Neoknorpels in Abhängigkeit der verwendeten Zellart ein im Vergleich zum spontanen Verlauf bzw. alternativen etablierten Verfahren

bessere histologische, (bio)mechanische, histologische und klinische Ergebnisse zeigen würde. Ein diesbezüglich interessanter Aspekt wäre die Art und das Ausmaß eines *in vivo* stattfindenden Remodellings der implantierten Konstrukte. In aufwendigen Studien wurde versucht, die zonale Gliederung des Gelenkknorpels (Abb. 3) beispielsweise mittels Photopolymerisation mehrlageriger Leitschienen *in vitro* zu rekonstruieren [168,230]. Aber auch diese aufwendigen Ansätze dienen letztlich lediglich der optimalen Vorbereitung eines *in vivo* nach Implantation stattfindenden Remodellings durch physiologische Reize wie Ernährung, parakrine und mechanische Stimulation. Nur hierdurch kann die finale Organisation und Struktur des regenerierten Gewebes erreicht werden [230]. Die entscheidende Frage ist, ob der chondrogene Status der Membrankulturen nach 7-tägiger Kultivierung von phC bzw. 21-tägiger chondrogener Differenzierung von hMSC angesichts der effektiven und effizienten Herstellung chondrogener Phänotypie eine ausreichende Ausgangsqualität für ein suffizientes *In-vivo*-Remodelling aufweist.

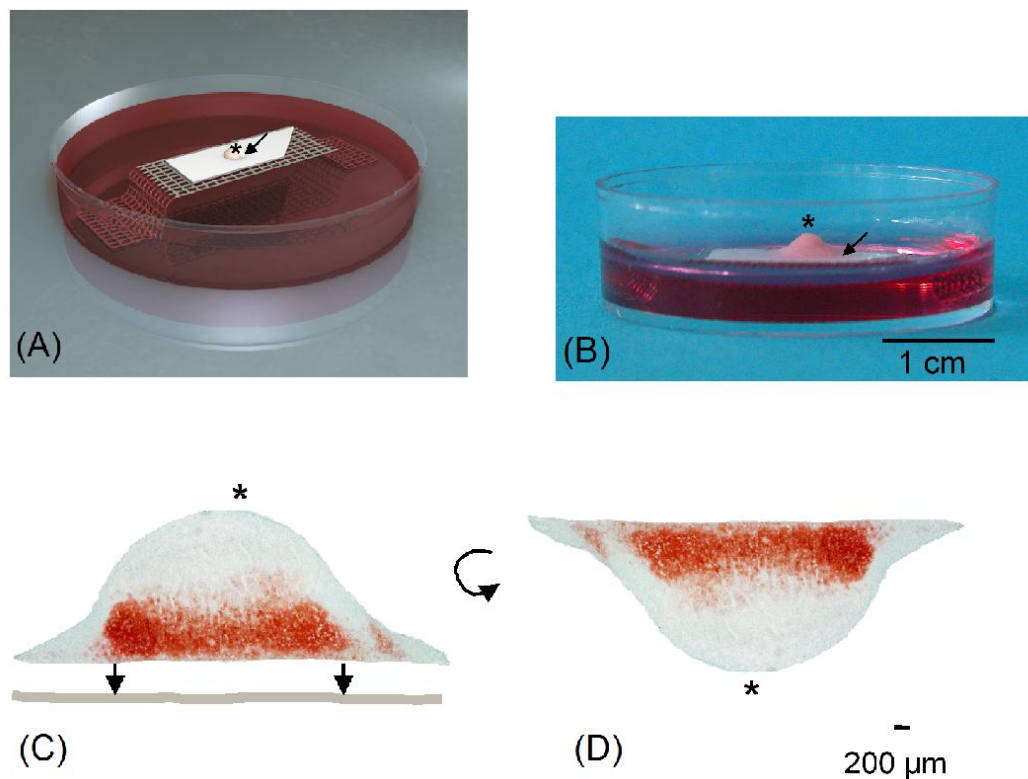


Abb. 22 Möglicher klinischer Einsatz chondrogener Membrankulturen am Beispiel chondrogen differenzierter hMSC. Die in der Petrischale ((A) und (B)) generierte Kultur (*) lässt sich technisch einfach mittels Pinzette an ihrem basalen Außenrand (Pfeile, (C)) von der Zelluloseazetatmembran abheben (C). Um 180° rotiert (D), wie bereits in Abb. 17 und 18 dargestellt, könnten Membrankulturen, die glatte und chondrogen differenzierte Schicht zum Gelenkspalt weisend (apikal), in Knorpeldefekte implantiert werden [178].

4.4 Wertigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen zur Regeneration des Gelenkknorpels

Die Regeneration des Gelenkknorpels wird gerade angesichts der steigenden Prävalenz fokaler Gelenkknorpeldefekte eine zunehmende klinische Herausforderung wachsender auch sozioökonomischer Bedeutung sein [111]. Die Entdeckung adulter Stammzellen als regenerative Populationen und ihrer Präsenz in entwickelten Organen hat zu einem wachsenden Interesse an der Nutzung dieser Zellen für regenerative und immunmodulatorisch-therapeutische Anwendungen geführt [99]. Adäquate Quelle der derzeit vielversprechendsten regenerativen Zellen, multipotenten Stammzellen, scheint das Knochenmark [231]. Dass das Knochenmark zur Regeneration von Knochen und Knorpel fähige Zellen wichtiger Proliferationskapazität enthält, war bereits in den späten 1960er Jahren gezeigt worden [232]. Zellbasierte Therapiestrategien zur Deckung begrenzter Gelenkknorpeldefekte stellen vielversprechende klinische Ansätze dar, sind aber in entscheidendem Maße von der Qualität der verwendeten Zellen abhängig. Neben innovativen Ansätzen wie Genterapie oder der Anwendung sowohl geeigneter Leitschienen als auch vielversprechender leitschienenfreier Gewebekulturmodelle steht die kritische Auswahl einer geeigneten Zellart und deren Quelle im Vordergrund [111,230]. Chondrozyten als reife Zellen des zu ersetzenden Gelenkknorpels weisen in dieser Hinsicht einige Nachteile auf. Zum einen dedifferenzieren isolierte phC *in vitro* rasch und proliferieren, ohne knorpel-spezifisch synthetisch aktiv zu sein [122,233]. Aus den im Rahmen der ACT gewonnenen Biopsaten lässt sich aufgrund der niedrigen Zelldichte des Gelenkknorpels nur eine begrenzte Zellzahl isolieren, was letztlich jene degenerierende Zellproliferation *in vitro* zur Generierung ausreichender Zellzahlen erforderlich macht. Hinzu kommt ein vorangehender Gelenkeingriff im Rahmen einer Arthroskopie, in welchem die Knorpelbiopsate zur Zellisolierung erst gewonnen werden müssen. Neben den allgemeinen Risiken des operativen Eingriffs kann der verursachte Entnahmedefekt wiederum klinische Beschwerden bereiten. Insgesamt ist ferner bei der Verwendung aus adultem Gelenkknorpel eines geschädigten Gelenks isolierter und in Monolayer-Kultur passagierter Chondrozyten von der Generierung eines minderwertigen Neoknorpels auszugehen [111,126,137]. Nach Reimplantation im Rahmen der ACT wird derzeit davon ausgegangen, dass eingesetzte Chondrozyten redifferenzieren und „hyalinartige“ Knorpelmatrix bilden können. Bei klinisch zufriedenstellenden Ergebnissen der ACT ist diese allerdings anderen Verfahren zur Füllung bzw. Deckung von begrenzten Gelenkknorpeldefekten nicht eindeutig überlegen [119,234,235]. Allerdings wird angenommen, dass im Gegensatz zu anderen Therapieansätzen (osteocondrale Grafts, Mikrofrakturierung) die Qualität des „hyalinartigen“ Knorpelgewebes bei der ACT höherwertig zu sein scheint und hierdurch bessere Langzeitergebnisse zu erwarten sein könnten [81]. Dies ließe gemeinsam mit den in 4.3.5 dargestellten Überlegungen zum Remodelling des Neoknorpels *in vivo* den Schluss zu, die Verbesserung der kartilaginären Qualität

des implantierten Gewebes könnte zu höherwertigem finalem Gewebe führen und damit ein verbessertes klinisches Outcome bedeuten.

Trotz der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Redifferenzierungskapazität sowohl der Membran- als auch der Pelletkultur bei der Kultivierung von dedifferenzierten pHc zeigte sich diese Problematik in der erreichten Gewebsqualität insbesondere im Vergleich mit den chondrogen differenzierten Kulturabschnitten derselben dreidimensionalen Kultursysteme, welche aus hMSC gewonnen wurden (Abb. 10 vs. Abb. 17, 18 und 19). Im Vergleich der aus pHc und hMSC generierten Membrankulturen wiesen die aus hMSC generierten Konstrukte qualitativ deutlich höherwertige histologische und immunhistochemische Eigenschaften auf. Auch die signifikante Überexpression chondrogener Marker ließ bei den aus hMSC chondrogen differenzierten Geweben auf eine effektive Chondrogenese schließen. Allerdings gestaltet sich letztlich ein Vergleich aufgrund der Unterschiede zwischen Spendern der pHc und hMSC schwierig (Alter, Entnahmebedingungen). Die aus hMSC generierten Gewebskonstrukte zeichneten sich ferner durch ihre Größe aus, indem sich aus hMSC prinzipiell implantierbare, leitschienenfreie Gewebskonstrukte generieren ließen (4.3.5).

Für adäquate autologe Gewebstransplantate wird insbesondere zunächst eine hohe (initiale) Zellzahl spezifisch und stabil differenzierter bzw. zu differenzierender Zellen benötigt. HMSC eignen sich aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate und ihrer Multipotenz hierfür als mögliche Regeneratquelle [236,237]. Neben der besseren Gewebsqualität des generierten Neoknorpels wiesen hinsichtlich der Proliferationskapazität im Rahmen der Monolayer-Kultivierung hMSC auch in dieser Arbeit eine klare Überlegenheit gegenüber pHc auf. HMSC können aus dem Beckenkamm via Biopsie gewonnen werden, alternativ eignen sich auch aus dem Fettgewebe isolierte mesenchymale Stammzellen, gleichwohl letztere ein geringeres chondrogenes Potential aufweisen bzw. anderen Differenzierungsprotokollen bedürfen [238-240]. Derartige Eingriffe sind allerdings insgesamt risikoärmer als eine Arthroskopie und könnten zur Anwendung von „All-in-one“-Prozeduren führen [210]. HMSC bieten als innovative Kandidaten für eine Zelltherapie die Vorteile einer einfachen Gewinnung zum autologen Einsatz (Knochemarkaspiration), die Möglichkeit der kurzzeitigen *In-vitro*-Expansion ohne Verlust des Stammzellcharakters (Selbsterneuerung) zur Gewinnung für den klinischen Einsatz geeigneter Zellzahlen, die Möglichkeit der Zellaufbewahrung mit nur minimalem Verlusten für eine autologe, zeitgerechte klinische Anwendung am Patienten („point-of-care delivery“), niedrige Immunogenität und die Tatsache, dass bis dato klinische Studien mit dem Einsatz autologer und allogener mesenchymaler Stammzellen keine unerwünschten Wirkungen der Zellen selbst aufzeigen konnten [99,241-246]. Zuletzt liegen praktisch keine ethischen Bedenken bei der Verwendung adulter pluripotenter Stammzellen im Gegensatz zur Anwendung embryonalen Stammzellen vor.

Die Transplantation von hMSC wurde von der FDA (US Food and Drug Administration) als sicher eingestuft, auch wenn langfristige, potentielle unerwünschte Wirkungen anhand der vorliegenden Studien nicht ausgeschlossen werden können. Zu diesen zählen die potentielle Maldifferenzierung oder Induktion

malignen Wachstums, sowie die Immunsuppression über immunmodulatorische Effekte [99]. Aufgrund ihrer hohen chondrogenen Qualität und weitgehender ethischer Unbedenklichkeit spielen aus dem Knochenmark stammende hMSC eine herausragende Rolle. Trotz der leichten Zugänglichkeit muss stets bedacht werden, dass es sich bei einer Knochenmarkaspiration um einen invasiven Eingriff mit potentiellen Risiken handelt und die gewonnene Menge an hMSC mit ca. 1–10 von 10^5 – 10^6 nukleären Zellen begrenzt ist [247]. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass mit Zunahme des Patientenalters mit abnehmender Differenzierungskapazität und damit möglichen Einschränkungen im therapeutischen Potential zu rechnen ist [248]. Diese Alterseffekte scheinen sich allerdings nicht signifikant auf das chondrogene Potential auszuwirken, da unter adäquaten Differenzierungsbedingungen *in vitro* eine effektive Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark älterer Patienten möglich und erfolgreich ist [149].

Ferner sind weitere Stimuli zur chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Erprobung und bieten ein weites Feld der Erprobung zur Generierung noch besseren auch leitschiene-freien Neoknorpels aus hMSC. Im Zentrum dieser Forschungsarbeit stehen insbesondere mechanische der In-vivo-Situation angepasste Reize. Hierunter fallen hydrostatischer Druck, dynamische Kompression und die Anwendung von Bioreaktoren, welche bei adäquater Anwendung zu vermehrter Proteoglykanproduktion, erhöhter Kollagen-Typ-II-Expression und besseren mechanischen Eigenschaften der generierten Knorpelkonstrukte führen [137,154,158-160,231,249,250]. In der vorliegenden Arbeit werden bei den Membrankulturen unter mechanischen Gesichtspunkten das Elastizitätsmodul des unterliegenden Substrats und die Eigenelastizität der Zelluloseazetatmembran (4.3.2) als chondrogen wirkende Faktoren bewertet [178,207]. Eine weitere Möglichkeit der Steigerung einer *In-vitro*-Chondrogenese besteht in der Applikation elektromagnetischer Felder. Für Pelletkulturen konnte *in vitro* eine erhöhte Kollagen-Typ-II-Expression sowie eine erniedrigte Kollagen-Typ-X-Expression im Sinne einer effektiveren und stabileren Chondrogenese festgestellt werden [161].

Die Erprobung des Einsatzes mesenchymaler Stammzellen zur Knorpelregeneration wird von wachsender Relevanz werden, da diese Zellquelle zur Generierung von autologem Neoknorpel sich auch in der vorliegenden Studie als geeignet und effektiv erwiesen hat. Gerade für die Membrankultur sind daher tierexperimentelle *In-vivo*-Studien erforderlich, die die Eignung mesenchymaler Stammzellen in diesem Modell erproben. Denn nicht nur das Differenzierungspotential, sondern auch trophische, anti-inflammatorische und immunmodulatorische Effekte, welche in signifikantem Ausmaß in lokalem Umfeld *in vivo* das regenerative Potential des residenten endogenen Knorpelgewebes anregen und erhöhen können, können zum hohen Stellenwert mesenchymaler Stammzellen *in vivo* beitragen [93]. Die vielversprechenden Möglichkeiten mesenchymaler Stammzellen zum Wohle des Patienten nutzen zu können, wird auch in Zukunft den engagierten Einsatz der Wissenschaft fordern.

5 Zusammenfassung

Aufgrund des niedrigen Regenerationspotentials hyalinen Gelenkknorpels bergen dessen Defekte das hohe Risiko einer sekundären Arthrose. Bei der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) werden bei fokalen Knorpeldefekten neokartilaginäre Implantate im Sinne des *Tissue Engineering* verwendet. Zur Generierung dieser Konstrukte *in vitro* werden Leitschienen („scaffolds“) eingesetzt, die Nachteile wie Toxizität oder Immunogenität aufweisen. Einen Lösungsansatz dieser Problematik stellt die Generierung leitschienenfreien Neoknorpels *in vitro* dar. In der vorliegenden Arbeit wurden primäre humane Chondrozyten (phC) und humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) in leitschienenfreien Kultursystemen kultiviert bzw. chondrogen differenziert. Das chondrogene Potential einer neuartigen leitschienenfreien Kulturform, der Membrankultur, wurde mit dem der etablierten Pelletkultur verglichen. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktorkombinationen analysiert.

In Membran- und Pelletkulturen überführte phC und hMSC wurden kultiviert bzw. chondrogen differenziert. Hierfür wurden phC sequenziell am Ende der Monolayer-Passagen P1–P5 in Membran- und Pelletkulturen überführt. Nach Überprüfung der mesenchymalen Stammzellplastizität mittels osteogener und adipogener Differenzierung wurden für die *In-vitro*-Chondrogenese der hMSC in Membran- und Pelletkulturen verschiedene Wachstumsfaktorkombinationen (TGF- β_3 +IGF-1, TGF- β_3 +FGF-2, TGF- β_3) appliziert. Die Auswertung der generierten Membran- und Pelletkulturen erfolgte histologisch (Toluidinblau-, Safranin-O-Färbung), immunhistochemisch (Kollagen Typ I und II) sowie mittels qRT-PCR (Kollagen Typ I, II und X, Aggrekan, COMP, SOX9) und anhand eines Glykosaminoglykanassays.

Bei Kultivierung der phC zeigte sich bei der Membrankultur anhand der histologischen, immunhistochemischen und quantitativen Expressionsanalysen im Vergleich zur Pelletkultur eine höhere Chondrogenität. Bis zur zweiten Passage bildeten phC insbesondere in Membrankulturen eine proteoglykan- und Kollagen-Typ-II-reiche Matrix. Im Verlauf der Monolayer-Kultivierung dedifferenzierten die phC sukzessive und exprimierten ab der dritten Passage kein Kollagen Typ II. Nach Transfer in Membran- und Pelletkulturen redifferenzierten phC bis zur zweiten Passage. Auch der komplette Expressionsverlust für Kollagen Typ II in der dritten Passage in Monolayer-Kultur konnte durch den Transfer in Membran- und Pelletkulturen rückgängig gemacht werden.

HMSC nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung in Membran- und Pelletkulturen zeigten eine proteoglykanreiche extrazelluläre Matrix und positive immunhistochemische Färbungen für Kollagen Typ II sowie die Expression chondrogener Marker wie Aggrekan, COMP, Kollagen Typ II und SOX9, aber auch Kollagen Typ I und X. Die Expression von Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II war in sämtlichen Pelletkulturen höher als in den analogen Membrankulturen. In den mit TGF- β_3 +IGF-1 behandelten Membrankulturen zeigte sich die höchste Aggrekan- und COMP-Expression, bei den Pelletkulturen hingegen bei den mit TGF- β_3 + FGF-2 differenzierten Kulturen. Die Anwendung von Wachstumsfaktorkombinationen (TGF- β_3 +IGF-1 oder TGF- β_3 + FGF-2) resultierte in beiden Kultursystemen in einer

signifikant höheren Expression des Kollagens Typ II als in den jeweils nur mit TGF- β_3 behandelten Kulturen. Unter den Pelletkulturen zeigten die mit TGF- β_3 + FGF-2 differenzierten Pellets die höchste Expression der chondrogenen Marker (Aggrecan, COMP, Kollagen Typ II, SOX9) und die niedrigste Kollagen-Typ-X-Expression. Die alleinige Applikation von TGF- β_3 führte in den Membrankulturen zum qualitativ besten histologischen Ergebnis sowie zur höchsten SOX9- und niedrigsten Kollagen-Typ-X-Expression gegenüber den mit Wachstumsfaktorkombinationen behandelten Membrankulturen. Sämtliche mit chondrogenen Wachstumsfaktoren behandelten Membrankulturen wiesen Anteile auf, die geringer oder nicht chondrogen differenziert waren. Diese befanden sich im Kontaktbereich der Kultur zur Atmosphäre, d.h. am lateralen Rand sowie in den apikalen Abschnitten.

Membran- und Pelletkulturen zeigten eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung und Zonen histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch hochwertigen Neoknorpels. Die im Vergleich zu den Pelletkulturen niedrigere relative Expression chondrogener Marker lässt sich durch den geringeren chondrogen differenzierten Anteil der Membrankulturen erklären. Die chondrogen differenzierten Zonen beider Kultursysteme waren jedoch qualitativ vergleichbar hochwertig. Bei den Pelletkulturen wurden durch die Applikation von TGF- β_3 +FGF-2 die besten chondrogenen Ergebnisse erzielt. Die sehr guten Ergebnisse der lediglich mit TGF- β_3 differenzierten Membrankulturen samt signifikant reduzierter Kollagen-Typ-X-Expression machen deutlich, dass die Zugabe weiterer Wachstumsfaktoren zur Differenzierung mit TGF- β_3 in der Membrankultur nicht empfehlenswert ist.

Die Ergebnisse der Kultivierung von pHc sowie Differenzierung von hMSC in der neuartigen Membrankultur weisen auf das hohe chondrogene Potential dieser Kulturform hin. Sie zeichnet sich durch eine hohe initiale Zelldichte, die Ernährung durch Diffusion, das unterliegende Substrat (Zelluloseazetatmembran) mit dessen Eigenelastizität, den reduzierten zentralen O₂-Gehalt und letztlich eine adäquate Größe aus. Die Membrankultur ermöglicht somit die effektive Generierung ausreichend großen kartilaginären Gewebes und eröffnet die Möglichkeit der Implantation in Gelenkknorpeldefekte. Für die Verwendung sowohl mesenchymaler Stammzellen als auch primärer Chondrozyten stellt daher die leitschienenfreie Membrankultur ein für den klinischen Einsatz geeignetes Kultursystem hoher Chondrogenität dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Drenckhahn D: **Allgemeine Gewebelehre**. In *Anatomie*. Benninghoff A, Drenckhahn D. München; Jena: Urban & Fischer; 2003:93-207.
2. Welsch U: *Lehrbuch Histologie*, 2. Aufl. München; Jena: Elsevier, Urban & Fischer Verl.; 2005.
3. Huber M, Trattning S, Lintner F: **Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage**. *Invest Radiol* 2000, **35**: 573-580.
4. Nehrer S, Minas T: **Treatment of articular cartilage defects**. *Invest Radiol* 2000, **35**: 639-646.
5. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R: **Toward a molecular understanding of skeletal development** *Cell* 1995, **80**: 371-378.
6. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K: **The control of chondrogenesis** *J Cell Biochem* 2006, **97**: 33-44.
7. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS: **Cellular interactions and signaling in cartilage development** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**: 309-334.
8. Coelho CN, Kosher RA: **Gap junctional communication during limb cartilage differentiation** *Dev Biol* 1991, **144**: 47-53.
9. Hall BK, Miyake T: **All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development** *Bioessays* 2000, **22**: 138-147.
10. Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS: **Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture** *Dev Biol* 1977, **60**: 69-82.
11. San Antonio JD, Tuan RS: **Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations** *Dev Biol* 1986, **115**: 313-324.
12. Thorogood PV, Hinchliffe JR: **An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb** *J Embryol Exp Morphol* 1975, **33**: 581-606.
13. Lefebvre V, Smits P: **Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005, **75**: 200-212.
14. Descalzi CF, Gentili C, Manduca P, Cancedda R: **Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture** *J Cell Biol* 1992, **117**: 427-435.

15. Mankin HJ: **Localisation of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. III. Mature articular cartilage.** *J Bone Joint Surg* 1963, **45A**: 529-540.
16. Szafranski JD, Grodzinsky AJ, Burger E, Gaschen V, Hung HH, Hunziker EB: **Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis**
Osteoarthritis Cartilage 2004, **12**: 937-946.
17. Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C: **Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration**
J Cell Biochem 2009, **107**: 383-392.
18. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A: **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation**
Dev Cell 2002, **3**: 439-449.
19. Trippel SB: **Growth factor inhibition: potential role in the etiopathogenesis of osteoarthritis**
Clin Orthop Relat Res 2004, S47-S52.
20. Roark EF, Greer K: **Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro**
Dev Dyn 1994, **200**: 103-116.
21. Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA: **Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis**
Endocrinology 1995, **136**: 2741-2751.
22. Zimmermann B, Cristea R: **Dexamethasone induces chondrogenesis in organoid culture of cell mixtures from mouse embryos**
Anat Embryol (Berl) 1993, **187**: 67-73.
23. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ: **In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis**
Proc Natl Acad Sci U S A 2002, **99**: 4397-4402.
24. Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, Zuffardi O *et al.*: **Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal**
Am J Hum Genet 1995, **57**: 1028-1036.
25. Bridgewater LC, Lefebvre V, De CB: **Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer**
J Biol Chem 1998, **273**: 14998-15006.
26. Liu Y, Li H, Tanaka K, Tsumaki N, Yamada Y: **Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene**
J Biol Chem 2000, **275**: 12712-12718.
27. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T *et al.*: **The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse**

- embryos**
Nat Genet 1995, **9**: 15-20.
28. Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De CB: **Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis**
Dev Dyn 1997, **209**: 377-386.
29. Grassel S, Ahmed N: **Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation**
Front Biosci 2007, **12**: 4946-4956.
30. Chun JS, Oh H, Yang S, Park M: **Wnt signaling in cartilage development and degeneration**
BMB Rep 2008, **41**: 485-494.
31. Stockwell RA: **The cell density of human articular and costal cartilage**
J Anat 1967, **101**: 753-763.
32. Wong M, Hunziker EB: **Articular cartilage biology and mechanics.** *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 1998, **6**: 4-12.
33. Muir H: **The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.**
Bioessays 1995, **17**: 1039-1048.
34. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS: **Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature.** *J Oral Maxillofac Surg* 1995, **53**: 924-929.
35. Benninghoff A: **Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil. Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion.** *Zeitschrift für Zellforschung* 1925, **2**: 783-862.
36. Poole CA: **Articular cartilage chondrons: form, function and failure.** *J Anat* 1997, **191 (Pt 1)**: 1-13.
37. Mankin HJ, Thrasher AZ: **Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage.** *J Bone Joint Surg Am* 1975, **57**: 76-80.
38. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.** *Instr Course Lect* 1998, **47**: 477-486.
39. Wotton SF, Duance VC: **Type III collagen in normal human articular cartilage.** *Histochem J* 1994, **26**: 412-416.
40. Muir H, Jacobs S: **Protein-polysaccharides of pig laryngeal cartilage**
Biochem J 1967, **103**: 367-374.
41. Hardingham TE, Muir H: **Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation.** *Biochem J* 1974, **139**: 565-581.
42. Hardingham TE: **The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates.** *Biochem J* 1979, **177**: 237-247.
43. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S: **Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair**
Clin Orthop Relat Res 2001, S26-S33.

44. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA *et al.*: **Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta**
Biochem J 1994, **302 (Pt 2)**: 527-534.
45. Heinegard D: **Proteoglycans and more--from molecules to biology**
Int J Exp Pathol 2009, **90**: 575-586.
46. Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D: **Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen**
J Biol Chem 1998, **273**: 20397-20403.
47. Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R: **Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias**
J Biol Chem 2004, **279**: 25294-25298.
48. Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D: **COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis**
J Biol Chem 2007, **282**: 31166-31173.
49. Chow G, Nietfeld JJ, Knudson CB, Knudson W: **Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis**
Arthritis Rheum 1998, **41**: 1411-1419.
50. Fernandez MP, Selmin O, Martin GR, Yamada Y, Pfaffle M, Deutzmann R *et al.*: **The structure of anchorin C11, a collagen binding protein isolated from chondrocyte membrane**
J Biol Chem 1990, **265**: 8344.
51. Turnay J, Pfannmuller E, Lizarbe MA, Bertling WM, von der MK: **Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V (anchorin C11)**
J Cell Biochem 1995, **58**: 208-220.
52. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ: **The cellular physiology of articular cartilage.** *Exp Physiol* 1996, **81**: 535-545.
53. Mow VC, Wang CC, Hung CT: **The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage.**
Osteoarthritis Cartilage 1999, **7**: 41-58.
54. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC: **Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response.**
J Orthop Res 1988, **6**: 777-792.
55. Keene DR, Engvall E, Glanville RW: **Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network**
J Cell Biol 1988, **107**: 1995-2006.
56. Kuettner KE: **Biochemistry of articular cartilage in health and disease.** *Clin Biochem* 1992, **25**: 155-163.
57. Hunziker EB, Michel M, Studer D: **Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing**
Microsc Res Tech 1997, **37**: 271-284.

58. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW: **Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages**
J Orthop Res 1987, **5**: 509-522.
59. Aydelotte MB, Kuettner KE: **Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production**
Connect Tissue Res 1988, **18**: 205-222.
60. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE: **Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism**
Connect Tissue Res 1988, **18**: 223-234.
61. Vanderploeg EJ, Wilson CG, Levenston ME: **Articular chondrocytes derived from distinct tissue zones differentially respond to in vitro oscillatory tensile loading**
Osteoarthritis Cartilage 2008, **16**: 1228-1236.
62. Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M: **The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans**
Biochim Biophys Acta 1973, **297**: 456-472.
63. Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ: **Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage**
J Orthop Res 1996, **14**: 681-689.
64. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P: **Development of synovial joints**
Birth Defects Res C Embryo Today 2003, **69**: 144-155.
65. Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J: **The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neof ormation during postnatal development**
Osteoarthritis Cartilage 2007, **15**: 403-413.
66. Maroudas AI: **Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage.** *Nature* 1976, **260**: 808-809.
67. Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD: **Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging**
Magn Reson Imaging 1995, **13**: 819-826.
68. Brighton CT, Heppenstall RB: **Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits**
J Bone Joint Surg Am 1971, **53**: 719-728.
69. Marcus RE, Srivastava VM: **Effect of low oxygen tensions on glucose-metabolizing enzymes in cultured articular chondrocytes**
Proc Soc Exp Biol Med 1973, **143**: 488-491.
70. Whalen RT, Carter DR, Steele CR: **Influence of physical activity on the regulation of bone density**
J Biomech 1988, **21**: 825-837.

71. Buckwalter JA: **Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies**
J Rheumatol Suppl 1995, **43**: 13-15.
72. Hunter W: **Of the structure and diseases of articulating cartilages.**
Philosophical Transactions (1683-1775) 1743, **42 (1742-1743)**: 514-521.
73. Mankin HJ: **The response of articular cartilage to mechanical injury**
J Bone Joint Surg Am 1982, **64**: 460-466.
74. Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B: **Chondroprogenitor cells of synovial tissue**
Arthritis Rheum 1999, **42**: 2631-2637.
75. De BC, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: **Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane**
Arthritis Rheum 2001, **44**: 1928-1942.
76. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ *et al.*: **The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population**
J Cell Sci 2004, **117**: 889-897.
77. DePalma AF, McKeever CD, Subin DK: **Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine**
Clin Orthop Relat Res 1966, **48**: 229-242.
78. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE: **Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions**
Clin Orthop Relat Res 1999, S176-S185.
79. Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K: **[Cartilage repair in the knee joint]**
Unfallchirurg 2006, **109**: 563-574.
80. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ: **Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis**
Ann Intern Med 2000, **133**: 321-328.
81. Vavken P, Samartzis D: **Effectiveness of autologous chondrocyte implantation in cartilage repair of the knee: a systematic review of controlled trials**
Osteoarthritis Cartilage 2010, **18**: 857-863.
82. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG: **Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies**
Arthroscopy 1997, **13**: 456-460.
83. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M: **Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies**
Arthroscopy 2002, **18**: 730-734.
84. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG *et al.*: **Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies**
Am J Sports Med 2004, **32**: 211-215.

85. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al.*: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells**
Science 1999, **284**: 143-147.
86. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR *et al.*: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow**
Nature 2002, **418**: 41-49.
87. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH: **Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood**
Blood 2004, **103**: 1669-1675.
88. Nauta AJ, Fibbe WE: **Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells**
Blood 2007, **110**: 3499-3506.
89. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR *et al.*: **The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury**
Stem Cells 2008, **26**: 1047-1055.
90. Ankrum J, Karp JM: **Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back**
Trends Mol Med 2010, **16**: 203-209.
91. Caplan AI: **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 1991, **9**: 641-650.
92. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ: **Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays**
Cell Stem Cell 2008, **2**: 313-319.
93. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD: **MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns**
Ageing Res Rev 2011, **10**: 93-103.
94. Li G, Zheng B, Meszaros LB, Vella JB, Usas A, Matsumoto T *et al.*: **Identification and characterization of chondrogenic progenitor cells in the fascia of postnatal skeletal muscle**
J Mol Cell Biol 2011.
95. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K: **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue**
Stem Cells 2006, **24**: 1294-1301.
96. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM: **Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells**
Blood 2001, **98**: 2615-2625.
97. da Silva ML, Caplan AI, Nardi NB: **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells**
Stem Cells 2008, **26**: 2287-2299.
98. Kolf CM, Cho E, Tuan RS: **Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation**
Arthritis Res Ther 2007, **9**: 204.

99. Parekkadan B, Milwid JM: **Mesenchymal stem cells as therapeutics**
Annu Rev Biomed Eng 2010, **12**: 87-117.
100. Lui PP, Rui YF, Ni M, Chan KM: **Tenogenic differentiation of stem cells for tendon repair-what is the current evidence?**
J Tissue Eng Regen Med 2011.
101. Schneider PR, Buhrmann C, Mobasher A, Matis U, Shakibaei M: **Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells**
J Orthop Res 2011.
102. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S *et al.*: **Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration**
Science 2005, **309**: 314-317.
103. Li H, Yu B, Zhang Y, Pan Z, Xu W, Li H: **Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes**
Biochem Biophys Res Commun 2006, **341**: 320-325.
104. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK: **Osteoblast and chondroblast differentiation**
Bone 1995, **17**: 77S-83S.
105. Nuttall ME, Gimble JM: **Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications**
Curr Opin Pharmacol 2004, **4**: 290-294.
106. Mackay DL, Tesar PJ, Liang LN, Haynesworth SE: **Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes**
J Cell Physiol 2006, **207**: 722-728.
107. Skalak R, Fox CF: **Tissue Engineering**. New York.
108. Nerem RM: **Cellular engineering**. *Ann Biomed Eng* 1991, **19**: 529-545.
109. Lysaght MJ, Reyes J: **The growth of tissue engineering**
Tissue Eng 2001, **7**: 485-493.
110. Langer R, Vacanti JP: **Tissue engineering**
Science 1993, **260**: 920-926.
111. Chung C, Burdick JA: **Engineering cartilage tissue**
Adv Drug Deliv Rev 2008, **60**: 243-262.
112. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM: **Principles of cartilage repair and regeneration**
Clin Orthop Relat Res 1997, 254-269.
113. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI: **Cartilage regeneration using principles of tissue engineering**
Clin Orthop Relat Res 2001, S161-S170.
114. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation**
N Engl J Med 1994, **331**: 889-895.

115. Brittberg M: **Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up**
Injury 2008, **39 Suppl 1**: S40-S49.
116. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V: **Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation**
Eur J Radiol 2006, **57**: 24-31.
117. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M *et al.*: **The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation**
Knee 2004, **11**: 51-55.
118. Chiang H, Jiang CC: **Repair of articular cartilage defects: review and perspectives**
J Formos Med Assoc 2009, **108**: 87-101.
119. Vasiliadis HS, Wasiak J, Salanti G: **Autologous chondrocyte implantation for the treatment of cartilage lesions of the knee: a systematic review of randomized studies**
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2010, **18**: 1645-1655.
120. Ventura A, Memeo A, Borgo E, Terzaghi C, Legnani C, Albisetti W: **Repair of osteochondral lesions in the knee by chondrocyte implantation using the MACI((R)) technique**
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2011.
121. Dixon S, Harvey L, Baddour E, Janes G, Hardisty G: **Functional outcome of matrix-associated autologous chondrocyte implantation in the ankle**
Foot Ankle Int 2011, **32**: 368-374.
122. von der Mark K, Gauss V, von der MH, Muller P: **Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture**
Nature 1977, **267**: 531-532.
123. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vecsei V, Schlegel W: **Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes**
J Bone Joint Surg Br 2004, **86**: 286-295.
124. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Baisch A, Sadick H, Verse T *et al.*: **Expression of collagen and fiber-associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation**
Int J Mol Med 2004, **14**: 1015-1022.
125. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K *et al.*: **In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes**
Otolaryngol Head Neck Surg 2006, **134**: 510-515.
126. Roberts SJ, Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM: **Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering**
Br Med Bull 2008, **86**: 7-22.
127. Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE: **Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue**
Exp Cell Res 1999, **253**: 681-688.

128. Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME: **Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers**
Biomaterials 2004, **25**: 5929-5938.
129. Barbero A, Grogan SP, Mainil-Varlet P, Martin I: **Expansion on specific substrates regulates the phenotype and differentiation capacity of human articular chondrocytes**
J Cell Biochem 2006, **98**: 1140-1149.
130. Gan L, Kandel RA: **In vitro cartilage tissue formation by Co-culture of primary and passaged chondrocytes**
Tissue Eng 2007, **13**: 831-842.
131. Benya PD, Shaffer JD: **Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels**
Cell 1982, **30**: 215-224.
132. Schulze-Tanzil G, de SP, Villegas CH, John T, Merker HJ, Scheid A *et al.*: **Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures**
Cell Tissue Res 2002, **308**: 371-379.
133. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M *et al.*: **Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro**
J Cell Biochem 2001, **81**: 368-377.
134. Mandl EW, van d, V, Verhaar JA, van Osch GJ: **Serum-free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity**
Tissue Eng 2002, **8**: 573-580.
135. Kim WS, Vacanti CA, Upton J, Vacanti JP: **Bone defect repair with tissue-engineered cartilage**
Plast Reconstr Surg 1994, **94**: 580-584.
136. Kurz B, Domm C, Jin M, Sellckau R, Schunke M: **Tissue engineering of articular cartilage under the influence of collagen I/III membranes and low oxygen tension**
Tissue Eng 2004, **10**: 1277-1286.
137. Chung C, Mesa J, Miller GJ, Randolph MA, Gill TJ, Burdick JA: **Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in photocrosslinked hyaluronic acid networks**
Tissue Eng 2006, **12**: 2665-2673.
138. van Osch GJ, Mandl EW, Jahr H, Koevoet W, Nolst-Trenite G, Verhaar JA: **Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering**
Biorheology 2004, **41**: 411-421.
139. Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I *et al.*: **Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes**
Tissue Eng 2002, **8**: 817-826.
140. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S *et al.*: **Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and**

- prolong skin graft survival in vivo**
Exp Hematol 2002, **30**: 42-48.
141. Dean RM, Bishop MR: **Graft-versus-host disease: emerging concepts in prevention and therapy**
Curr Hematol Rep 2003, **2**: 287-294.
142. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O: **HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells**
Exp Hematol 2003, **31**: 890-896.
143. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O: **Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex**
Scand J Immunol 2003, **57**: 11-20.
144. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M: **Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees**
Osteoarthritis Cartilage 2002, **10**: 199-206.
145. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K *et al.*: **Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells**
Osteoarthritis Cartilage 2007, **15**: 226-231.
146. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells**
Exp Cell Res 1998, **238**: 265-272.
147. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM *et al.*: **The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells**
J Bone Joint Surg Am 1998, **80**: 1745-1757.
148. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM: **Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components**
Exp Cell Res 2001, **268**: 189-200.
149. Im GI, Jung NH, Tae SK: **Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors**
Tissue Eng 2006, **12**: 527-536.
150. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A *et al.*: **Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling**
J Bone Miner Res 2006, **21**: 626-636.
151. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF: **FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *J Cell Physiol* 2005, **203**: 398-409.
152. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T *et al.*: **Growth factor combination for chondrogenic induction from human**

- mesenchymal stem cell**
Biochem Biophys Res Commun 2004, **320**: 914-919.
153. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O *et al.*: **Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro**
Mol Ther 2005, **12**: 219-228.
154. Heng BC, Cao T, Lee EH: **Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro**
Stem Cells 2004, **22**: 1152-1167.
155. Tang QO, Shakib K, Heliotis M, Tsiridis E, Mantalaris A, Ripamonti U *et al.*: **TGF-beta3: A potential biological therapy for enhancing chondrogenesis**
Expert Opin Biol Ther 2009, **9**: 689-701.
156. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI: **Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis**
J Cell Physiol 2001, **187**: 345-355.
157. Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT: **In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis**
Tissue Eng 2007, **13**: 2981-2993.
158. Hu JC, Athanasiou KA: **The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs**
Tissue Eng 2006, **12**: 1337-1344.
159. Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, Beaupre GS, Carter DR, Goodman SB *et al.*: **Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro**
Tissue Eng 2006, **12**: 2253-2262.
160. Gemmiti CV, Guldberg RE: **Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissue-engineered cartilage**
Tissue Eng 2006, **12**: 469-479.
161. Mayer-Wagner S, Passberger A, Sievers B, Aigner J, Summer B, Schiergens TS *et al.*: **Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**
Bioelectromagnetics 2010.
162. Hutmacher DW: **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage**
Biomaterials 2000, **21**: 2529-2543.
163. Tuli R, Li WJ, Tuan RS: **Current state of cartilage tissue engineering**
Arthritis Res Ther 2003, **5**: 235-238.
164. Frenkel SR, Di Cesare PE: **Scaffolds for articular cartilage repair**
Ann Biomed Eng 2004, **32**: 26-34.
165. Kulseng B, Skjak-Braek G, Ryan L, Andersson A, King A, Faxvaag A *et al.*: **Transplantation of alginate microcapsules: generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters**
Transplantation 1999, **67**: 978-984.

166. Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Berardi S, Mainil-Varlet P: **A static, closed and scaffold-free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro**
Osteoarthritis Cartilage 2003, **11**: 403-411.
167. Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM: **Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds**
Osteoarthritis Cartilage 2005, **13**: 297-309.
168. Sharma B, Williams CG, Kim TK, Sun D, Malik A, Khan M *et al.*: **Designing zonal organization into tissue-engineered cartilage**
Tissue Eng 2007, **13**: 405-414.
169. Kitahara S, Nakagawa K, Sah RL, Wada Y, Ogawa T, Moriya H *et al.*: **In vivo maturation of scaffold-free engineered articular cartilage on hydroxyapatite**
Tissue Eng Part A 2008, **14**: 1905-1913.
170. Adkisson HD, Gillis MP, Davis EC, Maloney W, Hruska KA: **In vitro generation of scaffold independent neocartilage**
Clin Orthop Relat Res 2001, S280-S294.
171. Waldman SD, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA: **Characterization of cartilagenous tissue formed on calcium polyphosphate substrates in vitro**
J Biomed Mater Res 2002, **62**: 323-330.
172. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE: **Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage**
Stem Cells 2007, **25**: 2786-2796.
173. Zimmermann B. Organoid-Kultur. Schiergens, T. S. 21-9-2006.: Personal Communication
174. Iwasa J, Ochi M, Uchio Y, Katsube K, Adachi N, Kawasaki K: **Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel**
Artif Organs 2003, **27**: 249-255.
175. Huang CY, Reuben PM, D'Ippolito G, Schiller PC, Cheung HS: **Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture**
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004, **278**: 428-436.
176. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: **Matrix elasticity directs stem cell lineage specification**
Cell 2006, **126**: 677-689.
177. Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A *et al.*: **The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta**
Biomaterials 2011, **32**: 3921-3930.
178. Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Docheva D, Schieker M, Betz OB *et al.*: **Membrane-based cultures generate scaffold-free neocartilage in vitro: influence of growth factors**
Tissue Eng Part A 2010, **16**: 513-521.

179. Trowell O: **The sensitivity of lymphocytes to ionising radiation**
J Pathol Bacteriol 1952, **64**: 687-704.
180. Trowell O: **A modified technique for organ culture in vitro**
Exp Cell Res 1954, **6**: 246-248.
181. Zimmermann B: **Lung organoid culture**
Differentiation 1987, **36**: 86-109.
182. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T, Shakibaei M: **Cultivation of human tenocytes in high-density culture**
Histochem Cell Biol 2004, **122**: 219-228.
183. Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE: **Cellular methods in cartilage research: primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells**
Methods 2008, **45**: 2-9.
184. Lindl T: *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 5. Aufl. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.; 2002.
185. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A *et al.*: **Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow**
J Cell Sci 2003, **116**: 1827-1835.
186. Shakibaei M, John T, de SP, Rahmanzadeh R, Merker HJ: **Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor**
Biochem J 1999, **342 Pt 3**: 615-623.
187. Malpeli M, Randazzo N, Cancedda R, Dozin B: **Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression**
Tissue Eng 2004, **10**: 145-155.
188. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M: **Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells**
Stem Cells 2006, **24**: 462-471.
189. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: **Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro**
J Cell Biochem 1997, **64**: 295-312.
190. Pittenger MF. U.S. Patent 5, 827, 740. 1998. 828.: Patent
191. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP *et al.*: **von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation**
Calcif Tissue Int 2003, **72**: 537-547.
192. Rosenberg L: **Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage**
J Bone Joint Surg Am 1971, **53**: 69-82.

193. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ: **Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O**
Histochemistry 1985, **82**: 249-255.
194. Martin I, Obradovic B, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: **Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage**
Ann Biomed Eng 1999, **27**: 656-662.
195. Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S *et al.*: **Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage**
Tissue Eng 2006, **12**: 2141-2149.
196. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: **Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue**
Biochim Biophys Acta 1986, **883**: 173-177.
197. Kim YJ, Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ: **Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258**
Anal Biochem 1988, **174**: 168-176.
198. Whitley CB, Ridnour MD, Draper KA, Dutton CM, Neglia JP: **Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion**
Clin Chem 1989, **35**: 374-379.
199. Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Redeker JI, Schmitt B, Buettner A *et al.*: **Scaffold-free 3D cellulose acetate membrane-based cultures form large cartilaginous constructs**
J Tissue Eng Regen Med 2010.
200. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O: **Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment**
Cell Transplant 2008, **17**: 987-996.
201. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D *et al.*: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement**
Cytotherapy 2006, **8**: 315-317.
202. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M: **Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study**
Histochem Cell Biol 2007, **128**: 507-520.
203. Baylink DJ: **Glucocorticoid-induced osteoporosis**
N Engl J Med 1983, **309**: 306-308.
204. Owen M, Friedenstein AJ: **Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors**
Ciba Found Symp 1988, **136**: 42-60.

205. Gaissmaier C, Koh JL, Weise K: **Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair**
Injury 2008, **39 Suppl 1**: S88-S96.
206. Richter W: **Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a biphasic collagen I/III fibrin matrix.** 2009.
207. Schiergens TS, Mayer-Wagner S, Sievers B, Buettner A, Redeker JI, Jansson V *et al.*: **Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a scaffold-free high-density diffusion-culture.** 2009; Miami, Florida.
208. Miura Y, Parvizi J, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW: **Brief exposure to high-dose transforming growth factor-beta1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro: a preliminary report**
J Bone Joint Surg Am 2002, **84-A**: 793-799.
209. Kim HJ, Im GI: **Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary**
J Orthop Res 2009, **27**: 612-619.
210. Steinwachs M. Autologous growth factors for chondrogenic differentiation of autologous MSC in vivo. Schiergens, T. S. 2009.: Personal Communication
211. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG *et al.*: **Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice**
Arthritis Rheum 2006, **54**: 3254-3266.
212. Dickhut A, Pelttari K, Janicki P, Wagner W, Eckstein V, Egermann M *et al.*: **Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage.** 2009; Miami, Florida.
213. Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP: **Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients**
Arthritis Rheum 2007, **56**: 177-187.
214. Fischer J, Dickhut A, Rickert M, Richter W: **Reduced hypertrophy and enhanced stabilization of the chondrogenic phenotype in MSC by co-culture with chondrocytes during chondrogenesis.** 2009; Miami, Florida.
215. Schiergens TS. Co-Culture of human mesenchymal stem cells and human adult articular chondrocytes in membrane-based high-density culture. Unpublished Work. 2008.
216. Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K *et al.*: **Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation**
J Bone Miner Metab 2005, **23**: 337-340.
217. Perrier E, Ronziere MC, Bareille R, Pinzano A, Mallein-Gerin F, Freyria AM: **Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells**
Biotechnol Lett 2011.
218. Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A *et al.*: **Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in**

- vitro macroaggregate culture system**
Tissue Eng 2004, **10**: 1695-1706.
219. Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN: **Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation**
J Bone Miner Res 2000, **15**: 166-174.
220. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA: **Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants**
J Anat 2004, **205**: 229-237.
221. Kruse FE, Schmitz W, Jaeger W, Gotz ML: **[Scanning electron microscopy image of the cells of the conjunctival epithelium in specimens from impression cytology]**
Klin Monbl Augenheilkd 1986, **188**: 29-32.
222. Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI: **Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes**
Cell Tissue Res 2011.
223. Zhou S, Cui Z, Urban JP: **Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study**
Arthritis Rheum 2004, **50**: 3915-3924.
224. Mueller J, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J: **Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures**
Cell Transplant 2011.
225. Ma T, Grayson WL, Frohlich M, Vunjak-Novakovic G: **Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues**
Biotechnol Prog 2009, **25**: 32-42.
226. Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F: **Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells**
J Cell Physiol 2005, **204**: 184-191.
227. Frenkel SR, Di Cesare PE: **Scaffolds for articular cartilage repair.** *Ann Biomed Eng* 2004, **32**: 26-34.
228. Gilpin DA, Weidenbecher MS, Dennis JE: **Scaffold-free tissue-engineered cartilage implants for laryngotracheal reconstruction**
Laryngoscope 2010, **120**: 612-617.
229. Li WJ, Chiang H, Kuo TF, Lee HS, Jiang CC, Tuan RS: **Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study**
J Tissue Eng Regen Med 2009, **3**: 1-10.
230. Klein TJ, Malda J, Sah RL, Hutmacher DW: **Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones**
Tissue Eng Part B Rev 2009, **15**: 143-157.

231. Potier E, Noailly J, Ito K: **Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics**
J Biomech 2010, **43**: 807-817.
232. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells**
Cell Tissue Kinet 1970, **3**: 393-403.
233. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L: **Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update**
Clin Orthop Relat Res 2001, S337-S348.
234. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A: **Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee**
Clin Orthop Relat Res 2000, 212-234.
235. Ruano-Ravina A, Jato DM: **Autologous chondrocyte implantation: a systematic review.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**: 47-51.
236. Caplan AI: **Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics.** *Tissue Eng* 2005, **11**: 1198-1211.
237. Graessel S, Ahmed N: **[Use of bone marrow mesenchymal stem cells for ex vivo cartilage regeneration]**
Orthopade 2007, **36**: 227-235.
238. Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B: **Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison**
J Orthop Res 2005, **23**: 1383-1389.
239. Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F: **Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix**
Tissue Eng Part A 2010, **16**: 523-533.
240. Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG: **Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue**
Tissue Eng Part B Rev 2010, **16**: 435-444.
241. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ: **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow**
Proc Natl Acad Sci U S A 2000, **97**: 3213-3218.
242. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ *et al.*: **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction**
Am J Cardiol 2004, **94**: 92-95.
243. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G: **Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients**
Ann Neurol 2005, **57**: 874-882.

244. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H *et al.*: **Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease**
Transplantation 2006, **81**: 1390-1397.
245. Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y, Jorgensen E, Mortensen S, Bindsvlev L *et al.*: **Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial**
Circulation 2007, **116**: 124-130.
246. Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J: **Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood**
Int J Hematol 2005, **81**: 126-130.
247. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A *et al.*: **Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow**
J Cell Sci 2003, **116**: 1827-1835.
248. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M: **Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells**
Bone 2003, **33**: 919-926.
249. Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M *et al.*: **Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro**
J Orthop Res 2003, **21**: 451-457.
250. Steinmetz NJ, Bryant SJ: **The effects of intermittent dynamic loading on chondrogenic and osteogenic differentiation of human marrow stromal cells encapsulated in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels**
Acta Biomater 2011.

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AT	Österreich
ATP	Adenosintrisphosphat
B	Belgien
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaare
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BSA	Bovines Serum Albumin
CH	Schweiz
COMP	Cartilage Oligomeric Protein
D	Deutschland
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, als Natriumsalz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Frankreich
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	Wachstums- und Differenzierungsfaktor
h	Stunde
HB-GAM	Heparin-bindendes Wachstum-assoziiertes Molekül
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
hnRNA	Heteronukleäre Ribonukleinsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	Insulin-like Growth Factor
Ihh	Indian Hedgehog
IU	Internationale Einheit

J	Japan
JNK	c-Junc-n-terminale Kinase
LOT	Chargennummer
Lsg	Lösung
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N-Cadherin	Neurales Cadherin
N-CAM	Neurales Zell-Adhäsionsmolekül
NL	Niederlande
P	Passage
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	0,1 % Tween 20 in PBS-Lösung
phC	Primäre humane Chondrozyten
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PTHrP	Parathyroid-hormone-related Peptide
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
SE	Schweden
SHC	Src homology collagen
Shh	Sonic Hedgehog
Shh	Sonic Hedgehog
SOX	Sry-related High Mobility Group Box
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
U	Units
U	Einheit
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
α MEM	Minimum Essential Medium Alpha

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die stete, immer freundliche Betreuung danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter E. Müller, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, sehr herzlich. Für die exzellente, intensive und liebevolle Betreuung meiner Arbeit möchte ich vor allem Frau PD Dr. Susanne Mayer danken. Durch ihre Geduld und ihren unermüdlichen Einsatz im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie war die Durchführung meiner Versuche und die Etablierung vieler Methoden erst möglich. Auch Frau Dr. rer. nat. Birte Sievers und Herr Dr. rer. nat. Oliver Betz haben mir in der Zeit meiner Arbeit hilfreich und stets mit gutem Rat und ihrer wissenschaftlichen Erfahrung zur Seite gestanden. Ebenfalls gilt den technischen Assistentinnen des Labors, Frau Bärbel Schmitt und Frau Julia Redeker, mein großer Dank für ihre guten Ratschläge und ihre tatkräftige Hilfe insbesondere bei den aufwendigen Auswertungen meiner Versuche. Darüber hinaus bin ich Lars Schliack für seine graphische Assistenz dankbar.

Den Kooperationspartnern unseres Labors möchte ich ebenfalls danksagen: Allen voran den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimed um Herrn Prof. Dr. med. M. Schieker der Chirurgischen Klinik Innenstadt für ihre Gastfreundschaft, das Erlernen vieler Methoden und die fortwährende Hilfestellung. Ebenso möchte ich nicht die Hilfe von Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Shakibaei und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl I der Anatomischen Anstalt, insbesondere beim Erlernen der Membrankultur, unerwähnt lassen.

Weiteren Dank möchte ich meinen Mitdoktoranden für die wunderbare und kollegiale Unterstützung und Zusammenarbeit entgegenbringen, für ihre anregenden Ratschläge und ihre Motivation zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Große Dankbarkeit gebührt meiner Freundin Katharina und ihrer Familie sowie meinem Bruder David für ihre guten Worte, ihre Ermutigung und Ablenkung zur rechten Zeit, für großartige menschliche und fachliche Unterstützung.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen lieben Eltern. Sie haben mir das Studium der Humanmedizin und die Arbeit im Labor ermöglicht und mich die gesamte Zeit in jeglicher Hinsicht bedingungslos unterstützt.