

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,  
Physikalische Medizin und Rehabilitation  
der Ludwig Maximilians Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

# Elektromagnetische Stimulation humaner mesenchymaler Stammzellen im Bioreaktor

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

Vorgelegt von  
Florian Hammerschmid

aus Wilhelmshaven

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker  
Prof. Dr. med. Stefan Milz  
Priv.Doz. Dr. med. Dorit Nägler

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Priv. Doz. Dr. med. Susanne Mayer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2016

## Eidesstattliche Versicherung

**Hammerschmid, Florian**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Elektromagnetische Stimulation humaner mesenchymaler Stammzellen im Bioreaktor**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 07.06.2016**

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

*In Gedenken an meinen verstorbenen  
Großvater Siegfried Wagner*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Der hyaline Knorpel .....	1
1.1.1. Grundlagen .....	1
1.1.2. Aufbau des hyalinen Knorpels .....	1
1.1.3. Hyaliner Knorpel in der Klinik.....	4
1.1.3.1 Knorpelläsionen.....	4
1.1.3.2 Therapieformen .....	5
1.2. Humane mesenchymale Stammzellen .....	8
1.2.1. Grundlagen und Funktion der HMSCs .....	8
1.2.2. Chondrogene Differenzierung der Stammzellen (Chondrogenese).....	9
1.2.3. Die terminale Hypertrophie .....	11
1.2.4. Einsatz von Stammzellen in der Forschung .....	12
1.3. Das elektromagnetische Feld.....	13
1.3.1. Grundlagen .....	13
1.4. Die (simulierte) Mikrogravitation.....	16
1.4.1. Grundlagen .....	16
1.4.2. Schwierigkeiten mit dem kommerziellen RCCS .....	17
1.5. Versuchsaufbau .....	17
1.6. Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1. Verwendete Materialien .....	19
2.1.1. Verwendete Geräte und Instrumente.....	19
2.1.2. Verwendete Software .....	20
2.1.3. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.4. Verwendete Chemikalien.....	22
2.1.5. Verwendete Medien, Zusätze sowie Antikörper und Seren.....	24
2.1.6. Verwendete Primer .....	25
2.2. Verwendete Zellen .....	26
2.2.1. Chondrozyten .....	26

---

2.2.2. Humane mesenchymale Stammzellen (HMSCs) .....	26
2.3. Zellkultur .....	27
2.3.1. Auftauen und Einfrieren der Zellen .....	27
2.3.2. Zellzahlbestimmung .....	28
2.3.3. Kultivierung und Vervielfältigung der Zellen im Monolayer.....	28
2.3.4. Pelletkultur .....	29
2.4. Stimulation im Magnetfeld.....	32
2.5. Simulierte Mikrogravitation.....	32
2.5.1. Erzeugung der simulierten Mikrogravitation.....	32
2.6. Versuchsaufbau .....	32
2.6.1. Versuchsaufbau mit angepasstem RCCS .....	37
2.7. Histologische und immunhistologische Färbungen .....	38
2.7.1. Anfertigen der Schnittpräparate.....	38
2.7.2. Safranin-O-Lichtgrün-Färbung.....	38
2.7.2.1. Grundlagen .....	38
2.7.2.2. Durchführung .....	39
2.7.3. Alzianblau-Färbung .....	39
2.7.3.1. Grundlagen .....	39
2.7.3.2. Durchführung .....	40
2.7.4. Toluidinblau-Färbung .....	40
2.7.4.1. Grundlagen .....	40
2.7.4.2. Durchführung .....	40
2.7.5. Immunhistologische Anfärbung von Kollagen II .....	40
2.7.5.1. Grundlagen .....	40
2.7.5.2. Durchführung .....	41
2.8. Molekularbiologische Methoden.....	42
2.8.1. Aufbereitung der Pellets mit dem Dismembrator.....	42
2.8.2. Isolierung der RNA .....	43
2.8.3. Synthese von cDNA .....	44
2.8.4. Quantitative RT-PCR.....	44
2.8.5. Mikroarray .....	47
2.8.5.1. Durchführung .....	47
2.8.5.2. Bestimmung der RNA Integrität im Bioanalyzer .....	47
2.8.5.3. Erst-Strang cDNA Synthese.....	47
2.8.5.4. Fragmentation und Labeling der cDNA .....	49
2.8.5.5. Hybridisierung.....	49
2.8.5.6. Waschen und Färben der Fragmente .....	49

2.8.5.7. Auswertung des Microarrays.....	49
2.9. Statistische Auswertung.....	50
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1. Vorversuche .....	51
3.1.1. Versuche mit Chondrozyten.....	51
3.1.1.1. Anzahl und Größe der Pellets im Bioreaktor .....	51
3.1.1.2. Einstellen der Drehgeschwindigkeit .....	52
3.1.1.3. Einstellen der Temperatur.....	53
3.1.1.4. Durchführung des Mediumwechsels .....	53
3.1.1.5. Ergebnisse aus den Vorversuchen .....	53
3.2. Hauptversuche.....	55
3.2.1. Differenzierungspotential der HMSCs.....	55
3.2.2. Übersicht der Gruppen und Versuche .....	55
3.2.3. Histologische Auswertung .....	55
3.2.3.1. Übersicht der Färbungen .....	55
3.2.3.2. Safranin-O-Fastgreen Färbung.....	57
3.2.3.3. Alzianblau-Färbung.....	58
3.2.3.4. Toluidinblau-Färbung .....	59
3.2.3.5. Kollagen II-Färbung .....	60
3.2.4. Ergebnisse der qt-RT-PCR.....	61
3.2.4.1. Gruppe 1.....	61
3.2.4.2. Gruppe 2.....	61
3.2.4.3. Gruppe 3.....	61
3.2.4.4. Gruppe 4.....	62
3.2.4.5. Gruppe 5.....	62
3.2.4.6. Gruppe 6.....	63
3.2.5. qt-RT-PCR Ergebnisse im Diagramm .....	63
3.2.5.1. Kollagen II Expression .....	64
3.2.5.2. Aggrekan Expression.....	65
3.2.5.3. Kollagen X Expression.....	66
3.2.5.4. SOX-9 Expression .....	67
3.2.5.5. Kollagen II / Kollagen X Quotient .....	68

3.2.6. Bioanalyser und Microarray - Auswertung .....	69
3.2.6.1. Bioanalyser Ergebnisse .....	69
3.2.6.2. Microarray-Ergebnisse .....	70
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	70
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1. Zellkultur .....	72
4.1.1. Einsatz von Stammzellen und Wachstumsfaktoren .....	72
4.2. Effekte durch Magnetfeldstimulation .....	72
4.2.1. Wirkmechanismus der Magnetfelder.....	73
4.2.2. Einfluss auf die Chondrogenität auf molekularbiologischer Ebene .....	74
4.2.3. Einfluss auf histologischer Ebene .....	75
4.2.4. Einfluss auf die terminale Hypertrophie .....	75
4.2.5. Kanzerogenität von Magnetfeldern .....	75
4.3. Effekte durch die (simulierte) Mikrogravitation.....	76
4.3.1. Einfluss auf die Chondrogenität auf molekularbiologischer Ebene .....	77
4.3.2. Einfluss auf histologischer Ebene .....	77
4.3.3. Einfluss auf die terminale Hypertrophie .....	78
4.4. Effekte durch Kombination von EMF und SMG .....	78
4.4.1. Effekte auf die Chondrogenität .....	79
4.4.1.1. Zellstress, MAP-Kinasen und Hitzeschockproteine .....	80
4.4.2. Effekte auf histologischer Ebene .....	80
4.4.3. Effekte auf die terminale Hypertrophie .....	80
4.5. Zusammenfassende Interpretation.....	81
<b>5. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>97</b>
<b>9. Curriculum Vitae .....</b>	<b>98</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung (Verweis auf dazu gehörige Abbildung)
aCT	Autologe Chondrozytentransplantation
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Bio	Bioreaktor
BK	Berufskrankheit
BMI	Body Mass Index
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serum Albumin
CP	Crossing-Point
DALYs	Disability adjusted life years
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DPX	Eindeckmittel zur Mikroskopie(xylolhaltig,wasserfrei)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMF	Elektromagnetisches Feld
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblastic growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH-Qu.	GAPDH-Quotient (Protein / GAPDH)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HSP	Hitzeschockprotein
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
IGF	Insulin like growth factor
ISS	Internationale Raumstation
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

## Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

---

M.	Morbus
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimum Essential Medium
MW	Mittelwert
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NSAIDs	Non steroidal anti-inflammatory drugs (=NSAR)
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
Ø	Ohne
OA	Osteoarthrose
OATS	osteocondral autograft transfer system
P	Passage
Pat.	Patient
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEMF	Gepulstes elektromagnetisches Feld
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
qt-RT-PCR	Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion
RCCS	Rotatory Cell Culture System
RCV	Rotatory Cell Vessel
RCVS	Rotatory Cell Vessel System
RIN	RNA-Integrität
RKI	Robert-Koch-Institut
(m)RNA	(Messenger) Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SOX-9 (5/6)	SRY(Sex deterring Region Y)-box 9 (5/6)
SPIA	Single Primer Isothermal Amplification
Stim.	Stimulation
Tab.	Tabelle
TGF	Tranforming growth factor
WHO	World Health Organisation (Welt Gesundheits Organisation)
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index

## Einheitenverzeichnis

[Hz] – Hertz – Einheit für die Schwingungen pro Sekunde

[T] – Tesla – Einheit für die Stärke des Magnetfeldes

[A] – Ampere – Einheit für die elektrische Stromstärke

[L] – Liter – Einheit für das Volumen

[°C] – Grad Celsius – Einheit für die Temperatur

[U/min] – Umdrehungen pro Minute – Rotationsgeschwindigkeit

[m] – Meter – Einheit für die Länge

[A/m] – Feldstärke – Einheit für die Stärke des Magnetfeldes

[Dyn/cm<sup>2</sup>] – Scherkraft – Stärke der wirkenden Scherkraft auf einen Körper

[inch] – Längenmaß – 1 inch = 2,54 cm



---

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Hyaliner Knorpel

### 1.1.1. Grundlagen

Hyaliner Knorpel gehört neben den anderen Knorpelarten (Faserknorpel, elastischer Knorpel) und dem Knochen zum Stützgewebe des Körpers und ist der am häufigsten vorkommende Knorpeltyp beim Erwachsenen [Welsch, 2006]. Er findet sich typischerweise im Bereich der Atemwege, der Rippen, dem Sternum und im Bereich der Gelenke. Darüber hinaus spielt er im Rahmen der indirekten, also perichondralen und enchondralen Ossifikation, eine entscheidende Rolle und bildet in Form eines Primordialskeletts die Grundlage für das spätere Knochenskelett [Welsch, 2006; Ulfing, 2005; Thakker et al., 2012].

Makroskopisch zeichnet er sich im Schnittpräparat durch sein glasig-milchiges Aussehen aus [Welsch, 2006].

Knorpelgewebe hat die Eigenschaft sich unter Druck und Zugbelastung zu verformen und bei Wegfall der einwirkenden Kraft wieder in die Ausgangsform zurückzukehren. Dadurch und durch seinen speziellen Aufbau, der zu einer gleichmäßigen Kraftübertragung und nahezu friktionslosem Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen führt, zeichnet sich der Gelenkknorpel besonders aus [Bruns et al., 2000].

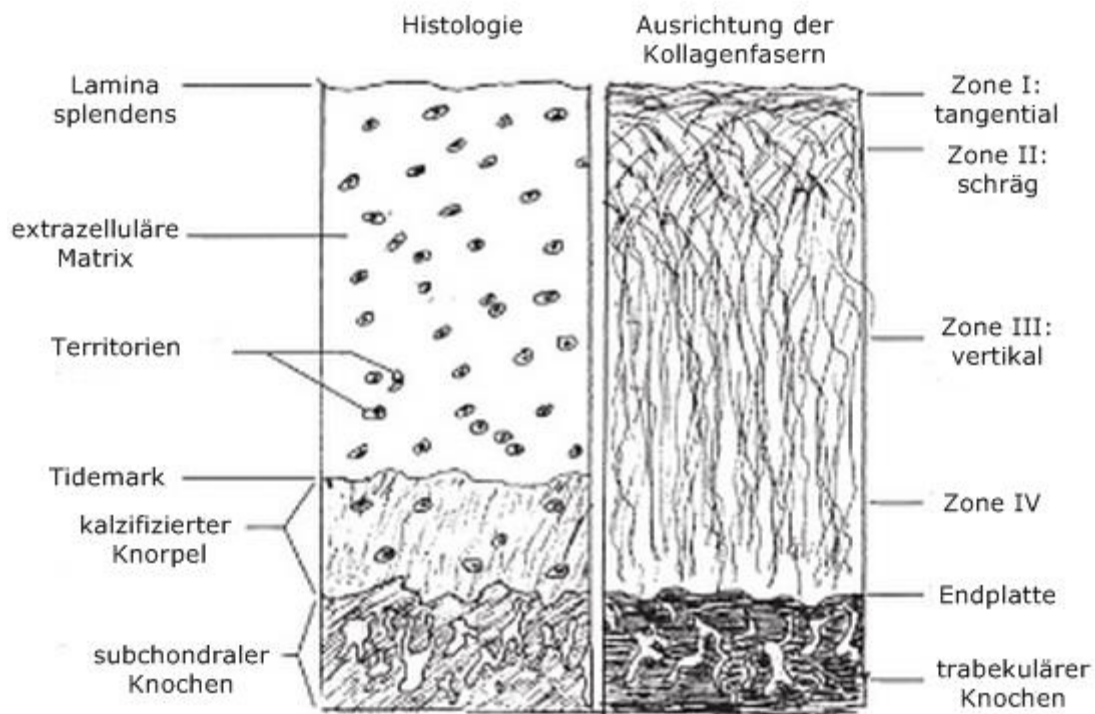
Während der juvenile Knorpel zum Teil noch durch Blutgefäße des subchondralen Knochens versorgt wird, ist der adulte hyaline Knorpel ausschließlich auf die Ernährung durch Diffusion angewiesen [Ingelmark et al., 1948] Daher zählt das Knorpelgewebe auch zu den bradytrophen Gewebetypen mit sehr geringer Zellteilungsrate und weist somit auch eine stark verminderte Regenerationsfähigkeit auf, wodurch sich die schlechte Selbstheilungstendenz bei Knorpelverletzungen erklären lässt [Beneke et al., 1966].

### 1.1.2. Aufbau des hyalinen Knorpels

Mikroskopisch betrachtet können beim hyalinen Knorpel zunächst die Chondrone (Territorien) von der extrazellulären Matrix (Interterritorium) unterschieden werden. Die Chondrone bestehen dabei aus mehreren Chondrozyten. Der Knorpel kann hierbei in 4 Zonen eingeteilt werden.

Als erstes findet man die oberflächliche und relativ schmal ausgeprägte Tangentialzone (Zone I) die durch parallel angeordnete Chondrozyten sowie einem tangentialen Kollagenfaserverlauf charakterisiert ist und überwiegend Lubricin

enthält. Es folgt die Übergangszone mit schräg verlaufenden Kollagenfasern (Zone II). Hier findet sich typischerweise Dekorin und Kollagen Typ VI. Die Radiärzone (Zone III) kennzeichnet der vertikale Aufbau der Chondrone und Kollagenfasern mit einem hohen Gehalt an Aggrekan und relativ niedrigem Kollagenanteil. Zone III ist darüber hinaus die breiteste Zone des hyalinen Knorpels. Es folgt nun als Übergang zum Knochen die bereits kalzifizierte Knorpelzone (Zone IV), die typischerweise reich an Kollagen X ist [Thakker et al., 2012].



**Abb. 1** Schematischer Aufbau des hyalinen Knorpels histologisch (links) sowie Darstellung der Ausrichtung der Kollagenfasern (rechts) mit den entsprechenden Knorpelzonen aus „Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease“

Der Knorpel enthält dabei verschiedene Kollagen Typen, die alle eine spezielle Funktion und Lokalisation aufweisen. Von besonderer Bedeutung ist das Kollagen Typ II, das ein Strukturprotein der extrazellulären Knorpelmatrix ist und in etwa 50% der Gesamtproteinmenge im hyalinen Knorpel ausmacht. Es ist dort mit einem Anteil von etwa 80% der am stärksten synthetisierte Kollagen-Typ [Gelse et al., 2003] und mit einem Anteil von 90-95% die grundlegende Komponente der Makrofibrillen des hyalinen Knorpels [Bhosale et al., 2008]. Kollagen II ist ein fibrilläres Kollagen das aus drei identischen alpha1-Ketten, die durch das Col2a1 Gen exprimiert werden, besteht. Das Gen befindet sich auf Chromosom 12q12-q13.2 [Gelse et al., 2003]. Als typisches Protein des hyalinen Knorpels ist es als Marker somit bestens geeignet.

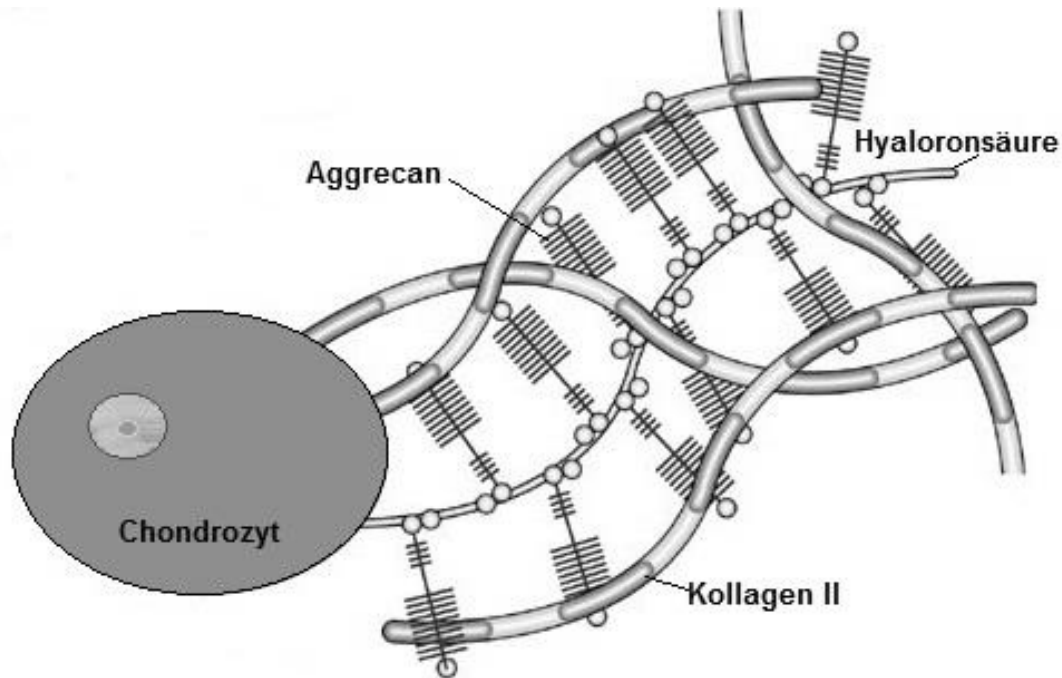
Ein anderer wichtiger Kollagen Typ und für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist Typ X. Es handelt sich hierbei um ein nicht-fibrilläres Kollagen, das vor allem von

hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. Diese sezernieren zu 45% Kollagen vom Typ X [Shen et al., 2005]. Kollagen X wird durch das Col10a1-Gen an Locus Chr. 6q21-q22 exprimiert und besteht aus 3 identischen Alpha1-Col10a-Proteinketten [Gelse et al., 2003].

Kollagen Typ	Lokalisation	Funktion
<b>II</b>	Grundlegende Komponente der Makrofibrillen (90-95%)	Zugfestigkeit
<b>VI</b>	Perizelluläre Matrix	Hilft den Chondrozyten bei der Bindung an die Matrix
<b>IX</b>	Querverbindung an Oberfläche der Makrofibrillen	Zugeigenschaften und interfibrilläre Verbindungen
<b>X</b>	Eng verbunden mit hypertrophen Zellen in kalzifizierten Knorpelschichten	Knorpelmineralisation
<b>XI</b>	Innerhalb oder auf Makrofibrillen	Faserbildung

**Tab. 1** Übersicht der Kollagentypen im Knorpelgewebe, mit ihrer Lokalisation und Funktion nach Bhosale et al.

Neben den Kollagenen spielen auch andere Proteoglykane der extrazellulären Matrix eine bedeutende Rolle. Darunter zählen Decorin, Biglycan, Fibromodulin und vor allem Aggrekan [Fox et al., 2009; Bhosale et al., 2008]. Aggrekan kann mit der Hyaluronsäure über ein Verbindungsprotein Aggregate bilden und ist wichtig für die osmotischen Eigenschaften des Knorpels, die entscheidend für die Dämpfung mechanischer Belastungen sind [Bhosale et al., 2008].



**Abb. 2** Aufbau des hyalinen Knorpels mit den von den Chondrozyten ausgehenden Kollagen II-Fasern und dem Aggrecan nach Chen et al. (modifiziert)

### 1.1.3. Hyaliner Knorpel in der Klinik

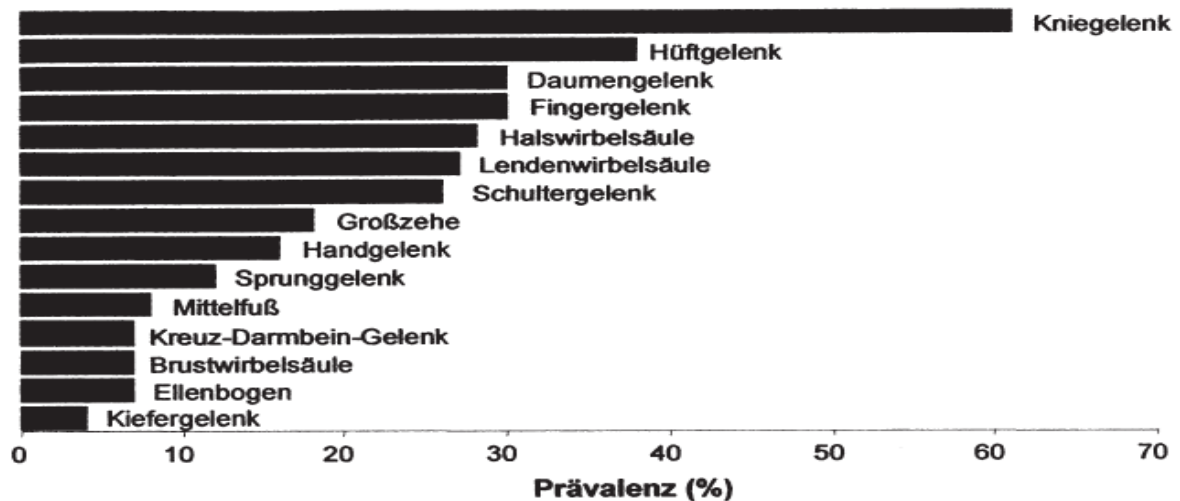
#### 1.1.3.1 Knorpelläsionen

Knorpelläsionen sind ein häufiges Krankheitsbild, wobei Läsionen des Knorpels als Chondromalazie bezeichnet werden. Diese werden klinisch in der Regel nach Outerbridge [Spahn et al., 2006] in vier Schweregrade eingeteilt, wobei das Endstadium der vollständige Durchbruch des Gelenkknorpels ist und letztlich zur Arthrose führt. Die Arthrose ist definiert als degenerative Erkrankung des hyalinen Knorpels mit Freilegung des subchondral gelegenen Knochens. Typischerweise leiden die Patienten zunächst unter leichten Anlaufschmerzen, die sich dann im Verlauf zu einem belastungsabhängigen Dauerschmerz entwickeln und zu einer eingeschränkten Gelenkfunktion führen. Erfahrungsgemäß sind vorwiegend Frauen im höheren Alter betroffen [RKI, 2008]. Die Arthrose hat einen enormen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten, was anhand der sog. „disability adjusted life years“ (DALY) durch die WHO quantifiziert wird und dort im Jahr 2000 den dritten Platz der Erkrankungen belegte. Zudem hat die Arthrose einen starken Einfluss auf die Volkswirtschaft. So wurden nach Angaben der Bundesregierung im Jahr 2002 7 Milliarden Euro für die Arthrose Behandlung ausgegeben, wobei bei diesem Betrag die Schäden durch vorübergehende Arbeitsunfähigkeit, Frühberentungen und Rehabilitationsmaßnahmen sowie Verlust der Erwerbstätigkeit nicht berücksichtigt sind [RKI, 2006]. Daher erklärt sich auch das Interesse der Forschung neue, effektive und möglichst günstige Behandlungsformen zu finden. Hierbei ist das im Rahmen



dieser Doktorarbeit vorgestellte Modell mit Magnetfeld und simulierter Schwerelosigkeit eine kostengünstige Option.

Betrachtet man die Prävalenz der verschiedenen Arthroseformen, so sieht man, dass die häufigste Lokalisation das Kniegelenk ist, gefolgt vom Hüftgelenk. In über 80% der Fälle ist bei der Gon- und Coxarthrose auch ein beidseitiger Gelenkbefall festzustellen (Gonarthrose 87,4%, Coxarthrose 82,1%) [Günther et al., 2002].



**Abb. 3** Übersicht der häufigsten Arthroseformen aus Engelhardt et al. Die Daten wurden durch den Arthrose-Hilfe e.V. erhoben und geben die Verteilung unter Arthrose-Kranken in Abhängigkeit der Lokalisation an.

### 1.1.3.2 Therapieformen

#### Konservative Therapieformen

Leichte Formen der Arthrose im Anfangsstadium können zunächst konservativ mit nicht-pharmakologischen Maßnahmen behandelt werden. Hierzu zählen unter anderem Änderungen der Lebensgewohnheiten, die physikalische Therapie, die Physiotherapie, die Akkupunktur sowie die Verschreibung von diversen Hilfsmitteln zur Gelenkentlastung [Felson et al., 1992; Waller et al., 2011; Hackenbroch et al., 1998; Deyle et al., 2000; Diehl et al., 2013].

Eine besondere Rolle im Rahmen der konservativen Therapie spielt der Einsatz von Analgetika, insbesondere Präparate aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika. Nach aktueller Studienlage ist dabei die Therapie mit nicht-selektiven Inhibitoren der Cyclooxygenase 1 und 2, wie beispielsweise Diclofenac, hinsichtlich der Schmerzlinderung und Reduktion der Funktionseinschränkung der alleinigen Schmerztherapie mit Paracetamol überlegen [Felson et al., 2009]. Ferner bieten manche NSAR neben der oralen Einnahme auch noch die Möglichkeit der topischen Anwendung, wodurch systemische Wirkungen und Nebenwirkungen vermieden

werden können [Felson et al., 2009]. Allerdings zeigt die topische Anwendung eine geringere Wirkung als die orale Anwendung und ab der dritten Behandlungswoche zeigt sich kein Vorteil mehr gegenüber einer Placebobehandlung [Lin et al., 2004].

Eine weitere Möglichkeit bieten die selektiven Hemmer der Cyclooxygenase 2. In einem Vergleich zwischen Celecoxib und Diclofenac in Kombination mit Omeprazol konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen in Form von Ulcusblutungen, die typisch für die Gruppe der unselektiven COX-Hemmer sind, bei gleicher Effektivität reduziert werden kann [Chan et al., 2002].

In der Literatur wird auch der Einsatz von Stoffen wie Hyaluronsäure, Chondroitin oder Glucosamin im Rahmen der konservativen Therapie beschrieben. Diese Stoffe zählen zur Gruppe der sogenannten Symptomatic Slow Acting Drugs und sollen verschiedene günstige Wirkungen auf Symptomatik und Verlauf der Arthrose haben, sind jedoch in ihrer tatsächlichen Wirksamkeit nicht unumstritten [Bijlsma et al., 2011].

### **Operative Therapieformen**

Im weiteren Verlauf ist eine konservative Therapie alleine meist nicht mehr ausreichend, sodass eine Operation die einzige Möglichkeit bietet die Beschwerden zu therapieren. Je nach Lokalisation und Schweregrad gibt es verschiedene operative Verfahren.

Eine Möglichkeit im Bereich der operativen Therapieformen stellen die knorpelregenerativen Verfahren dar. In frühen Stadien gibt es dabei bei alleiniger Knorpelaffektion, also ohne Freilegung des darunter befindlichen Knochens, die Möglichkeit der sogenannten Oberflächenversiegelung des Knorpels durch Debridement oder der Knorpelglättung mittels Plasmafrequenzablation, was zu einer Diffusionsbarriere zwischen Knorpel und Knochen führt [Rudert et al., 1998; Spahn et al., 2010].

Eine weitere Möglichkeit stellen Verfahren dar, die durch Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu einer Knorpelregeneration führen sollen [Vogt et al., 2007]. Bereits früher zeigte sich in Tierversuchen, dass Knorpeldefekte bei gleichzeitiger knöcherner Beteiligung bessere Heilungstendenzen zeigten als eine alleinige Knorpelaffektion [Wakitani et al., 1994]. Daher beruht das Prinzip der regenerativen Verfahren auf der Freilegung des subchondralen Knochens und Eröffnung des Markraumes und der damit verbundenen Freisetzung multipotenter Stammzellen. Unterschieden werden kann hierbei eine großflächige

Markraumfreilegung wie bei der Abrasionsarthroplastik von punktuellen Freilegungen, wie sie typisch für die Pridie-Anbohrung und die Mikrofrakturierung sind. Typischerweise entsteht durch den Einsatz dieser Therapieformen jedoch statt hyalinem Knorpel Faserknorpel als Ersatz [Vogt et al., 2007].

Eine weitere Therapieoption liefern die sogenannten Knorpelersatzverfahren, wie die OATS und die ACT, deren Ziel es ist den Defekt durch den Transfer von Knorpelgewebe bzw. Knochenknorpelzylindern in den Defektbereich zu korrigieren. Bei der OATS handelt es sich um eine Transplantation von Knochenknorpelzylindern von einem nicht belasteten Bereich des Gelenks in kleinere arthrotische Schädigungen. Hierbei werden Knochenknorpelzylinder aus einem minder belasteten Bereich in den Defekt transplantiert. Hierbei zeigte sich eine Verbesserung der Beschwerden nur über wenige Jahre, was auf die entstehende Inkongruenz durch das Transplantat zurückgeführt wird. Bei größeren Defekten kommt daher die ACT zum Einsatz [Rudert et al., 1998 ; Vogt et al., 2007].

Eine andere gängige Methode, die vor allem bei größeren Knorpeldefekten zum Tragen kommt, ist die sogenannte autologe Chondrozytentransplantation (ACT). Hierbei handelt es sich um einen zweizeitigen Eingriff, bei dem in der ersten Sitzung Knorpelzellen aus einem nicht belasteten Bereich eines Gelenks entnommen und anschließend in einer Zellkultur für 2-3 Wochen vermehrt werden. Sobald sich die Zellen ausreichend vermehrt haben wird dieser „Ersatzknorpel“ in einem zweiten Eingriff an die defekte Stelle transplantiert und zur Einheilung in ein Vlies eingelegt das per Naht oder mittels Fibrinkleber in der Defektzone befestigt wird [Brittberg et al., 1994 ; Rudert et al., 1998; Vogt et al., 2007]. Zwar konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass sich in einem Zeitraum von 2-10 Jahren das klinische Bild in 70-96% der Fälle deutlich verbessert [Grifka et al., 2000], aber dennoch ist der entstehende Knorpel histologisch betrachtet eher als knorpelähnliches Weichteilersatzgewebe zu werten [Martinek et al., 2003].

Ist durch die oben beschriebenen knorpelregenerativen Maßnahmen oder Knorpelersatzverfahren keine ausreichende Kontrolle der Beschwerdesymptomatik möglich und die Lebensqualität des Patienten deutlich eingeschränkt oder liegt bereits eine Arthrose vor, dann ist meist der endoprothetische Gelenkersatz ultimo ratio [DGU, 2009].

Bei jungen Patienten kann über den (präventiven) Einsatz von Osteotomien zur Gelenkentlastung durch eine Korrektur fehlgestellter Achsen [Duchow et al., 2003]

bzw. zum Gelenkerhalt bei Erkrankungen, wie zum Beispiel die Durchführung einer hohen tibialen Osteotomie bei der medialen Gonarthrose, diskutiert werden [Gollwitzer et al., 2012].

## 1.2. Humane mesenchymale Stammzellen

### 1.2.1. Grundlagen und Funktion der HMSCs

Die Forschung mit adulten humanen mesenchymalen Stammzellen geht auf die Arbeit von Alexander J. Friedenstein aus den späten 60er und frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zurück, der damals feststellte, dass es im Knochenmark Zellen geben muss, die noch in der Lage sind sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren [Afanasyev et al., 2009].

Entwicklungsmedizinisch betrachtet stammen die Stammzellen aus dem Mesoderm und werden somit bereits in der Embryonalphase angelegt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei adulten HMSCs um multipotente Stammzellen handelt, die in der Lage sind sich in Abhängigkeit der einwirkenden Stimulationsfaktoren in verschiedene Gewebesubtypen zu differenzieren (vergleiche Abb. 4) [Pittenger et al., 1999; Caplan et al., 2007].

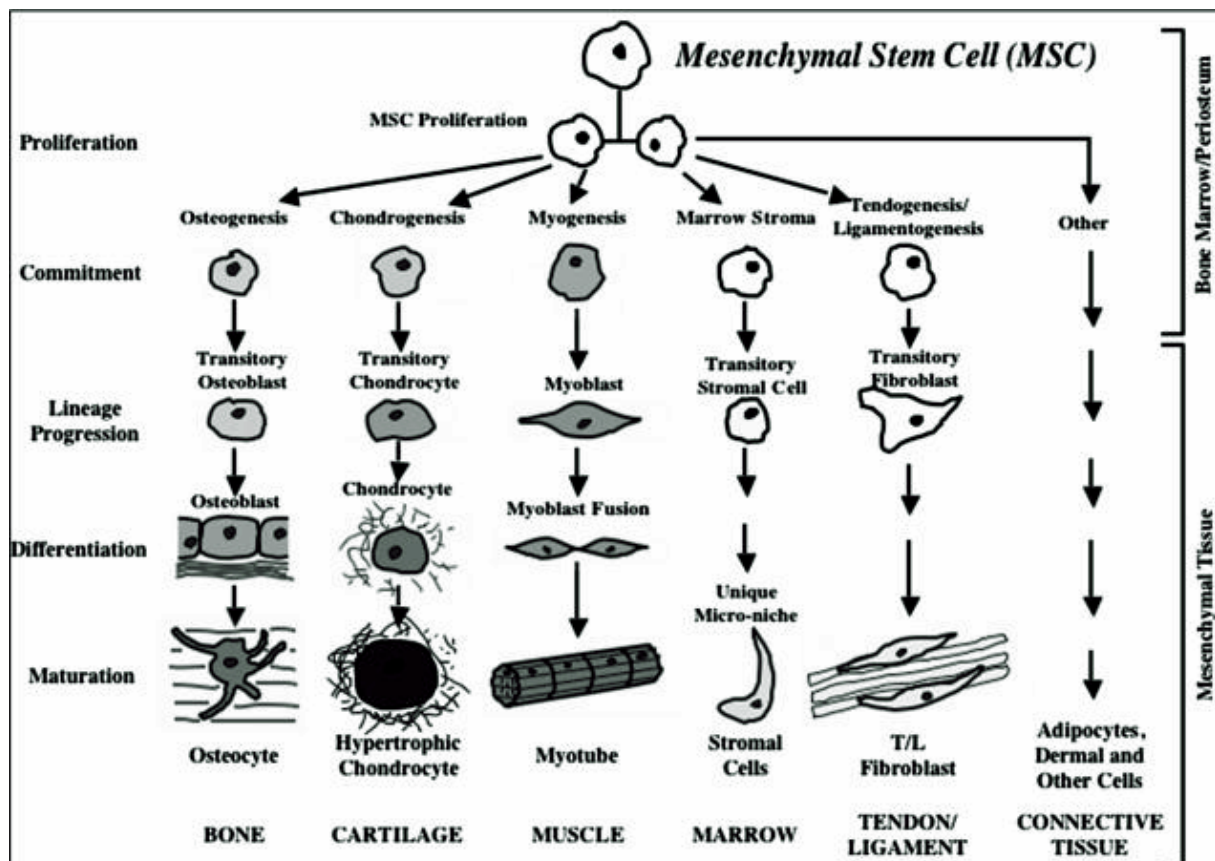


Abb. 4 Übersicht über die Differenzierungsmöglichkeiten von HMSCs in die verschiedenen Gewebearten nach Caplan et al.

Gewonnen werden die Zellen meist durch eine direkte Entnahme aus knochenmarkreichem Knochen, in der Regel aus dem Bereich der Beckenschaufel, da dort eine minimal invasive Entnahme möglich ist.

Da in dem entnommenen Knochenmark nicht nur undifferenzierte Stammzellen vorliegen, sondern bereits differenzierte Vorläuferzellen bestimmter Zelllinien muss durch verschiedene Filterungsschritte und immunologische Reaktionen von Oberflächenproteinen eine Selektion der Stammzellen erfolgen.

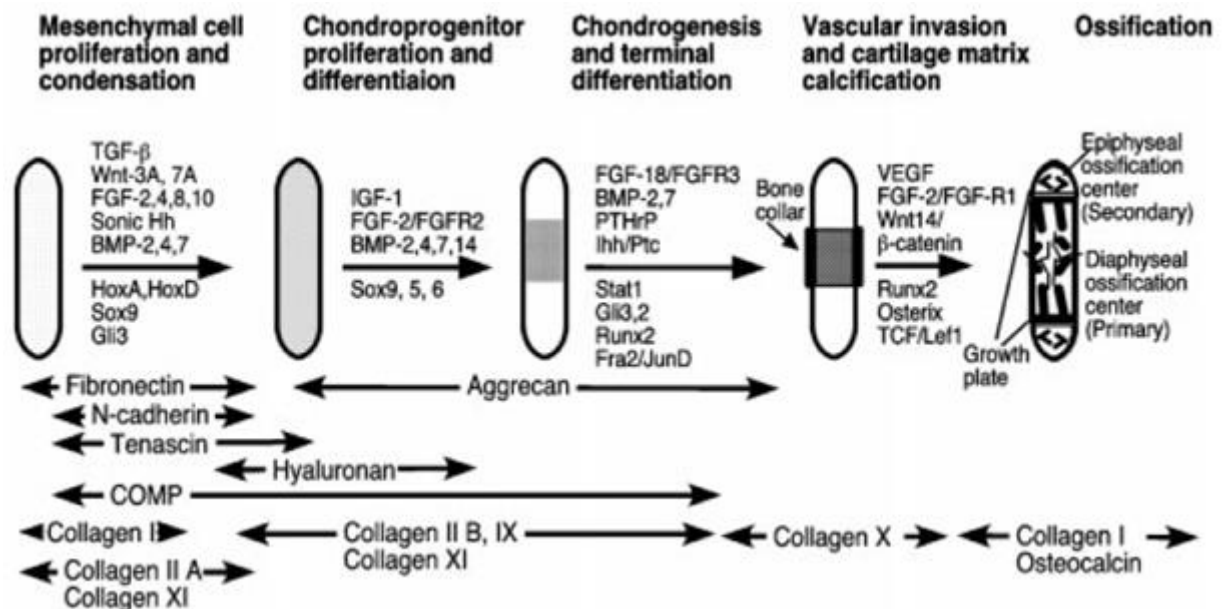
Eine neuere Methode, die vor allem durch die Forschung im Rahmen der Knochenmarkspende Einzug gehalten hat, ist die primäre Stimulation des Patienten bzw. Spenders mit einem speziellen Wachstumsfaktor, dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), der zu einer Auswanderung der Stammzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf führt. Diese Zellen können dann durch aufwendige Filtermethoden aus dem Blut herausgefiltert und für den Gebrauch aufbereitet werden [Kassis et al., 2006].

Eine weitere Quelle für Stammzellen könnte in Zukunft auch in den zahlreich vorkommenden Fettzellen liegen. So ist es gelungen bereits adipogen differenzierte Zellen so zu stimulieren, dass diese danach erneut Stammzeleigenschaften aufwiesen [Shen et al., 2011].

Auf Grund der Multipotenz und der relativ einfachen Gewinnung gibt es in der Forschung immer wieder Ansätze Stammzellen für die Erneuerung von defekten Zellen, insbesondere von bradytrophem Gewebe, das nur sehr geringe Eigenregenerationsfähigkeiten besitzt, zu nutzen.

### **1.2.2. Chondrogene Differenzierung der Stammzellen (Chondrogenese)**

Die Chondrogenese geht von Zellen des Mesoderms aus und führt im Rahmen der Skelettentwicklung zur enchondralen Ossifikation [Goldring et al., 2006]. Durch die Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren, insbesondere TGF- $\beta$  [Tang et al., 2009], kommt es zur Differenzierung in chondrogene Vorläuferzellen, die sich dann zu Chondrozyten entwickeln. Diese Chondrozyten exprimieren die typische Knorpelmatrix, die reich an Kollagen II und Aggrekan ist [Mackay et al., 1998]. Allerdings kommt es im weiteren Verlauf zu einer Einwanderung von Gefäßen und Kalzifikation der Knorpelmatrix [Goldring et al., 2006]. Diese Mineralisierung der Matrix wird auch als terminale Hypertrophie oder Dedifferenzierung bezeichnet und führt letztlich zur Ossifikation [Shintani et al., 2013; Pelttari et al., 2006].

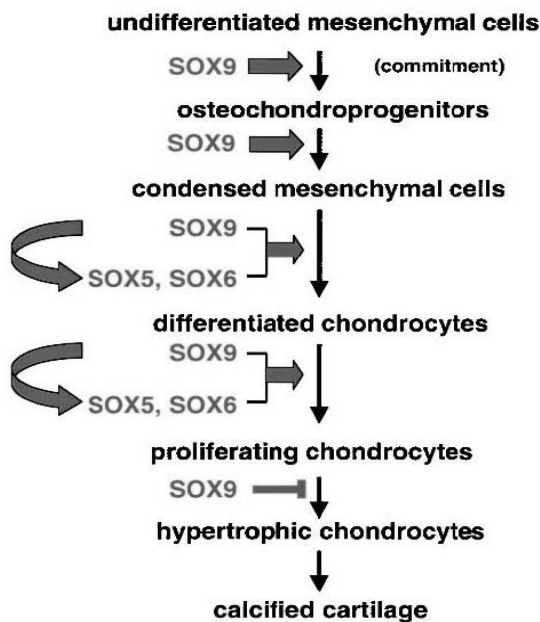


**Abb. 5** Ablauf der Chondrogenese entnommen aus der Arbeit von Goldring et al.. Oberhalb und unterhalb der Pfeile, die sich zwischen dem skizzierten Röhrenknochen befinden sind die entscheidenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren genannt, unter der Zeichnung befinden sich die typischen Matrixproteine entsprechend dem Entwicklungsstadium

Die Multipotenz der Stammzellen haben wir in unserem Versuchsaufbau dazu genutzt, um die HMSCs durch eine chondrogene Stimulation in Knorpelgewebe zu differenzieren. Die chondrogene Differenzierung ist dabei eng mit der osteogenen verknüpft [Akiyama et al., 2002].

Wichtige Grundlage spielen verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren. Essentiell hierfür ist die Wirkung von SOX-9. Bei SOX-9 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der vom gleichnamigen Gen auf Chromosom 17q24 exprimiert wird [Prior et al., 1996]. Ein direkter Zusammenhang mit der Regulation von der Kollagen II - Expression konnte durch Bell nachgewiesen werden [Bell et al., 1997]. Die Forschungsgruppe um Bi konnte darüber hinaus nachweisen, dass SOX-9 für die Bildung von Knorpel erforderlich ist [Bi et al., 1999], da es an essentielle Sequenzen des Col2a1 und Kollagen  $\alpha$ 2 binden kann und dort als Enhancer die Expression, auch in nicht chondralen Zellen, verstärkt. Darüber hinaus konnte auch nachgewiesen werden, dass SOX-9 eine wichtige Rolle in der Chondrogenese in der Embryonalphase von Mäusen spielt [Wright et al., 1995]. In der Literatur wird SOX-9 ferner als möglicher Marker für nicht-hypertrophe Zellen erwähnt. So konnte SOX-9 zwar in Chondrozyten und den Progenitorzellen nachgewiesen werden, war jedoch in hypertrophen Zellen nicht oder nur kaum vorhanden [Ng et al., 2008]. SOX-9 führt zusammen mit SOX-5 und SOX-6 zu einer Aktivierung des Col2a1-Enhancers und

somit zu einer vermehrten Expression des Col2a Gens, das für Kollagen II codiert [Komori et al., 2009].



**Abb. 6** Schematische Darstellung des SOX-9 Pathway im Rahmen der enchondralen Ossifikation nach Akiyama et al.

Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Familie sind ein entscheidender Faktor für die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (siehe Abb. 4) [Tang et al., 2009, Akiyama et al., 2002], wobei TGF- $\beta$ 3 und TGF- $\beta$ 2 hierbei dem TGF- $\beta$ 1 überlegen sein sollen [Fan et al., 2008]. In dieser Arbeit wurden die Zellen daher mit TGF- $\beta$ 3 stimuliert.

### 1.2.3. Die terminale Hypertrophie

Wie man anhand der Abbildung 5 erkennen kann ist die terminale Hypertrophie der letzte Entwicklungsschritt vor der Ossifikation des Knorpels im Rahmen seiner gesamten Entwicklung von der Stammzelle ausgehend. Das Stadium der Hypertrophie ist durch eine Zunahme an Kollagen X, sowie einer Abnahme des knorpelspezifischen Markers Kollagen II gekennzeichnet. Aktuell ist das Problem der Hypertrophie eine der größten Herausforderungen im Rahmen des Tissue Engineerings mit chondrogen differenzierten Stammzellen [Peltari et al., 2006, Shintani et al., 2013], denn durch die Hypertrophie und Kalzifizierung verliert das Gewebe die knorpeltypischen Eigenschaften und wird zu Knochen, was dem Ziel der

Verwendung als Knorpelersatzmaterial im Wege steht. Daher befassen sich zahlreiche Arbeiten, wie auch diese, mit möglichen adjuvanten Behandlungsverfahren, um diesen unerwünschten Schritt der Hypertrophie zu vermindern oder im Idealfall gar zu verhindern, damit die Chondrogenität der differenzierten Stammzellen erhalten bleibt.

#### **1.2.4. Einsatz von Stammzellen in der Forschung**

Der Einsatz der Stammzellen in der medizinischen Forschung ist breit gefächert. So konnte anhand von Tierversuchen mit Schweinen gezeigt werden, dass ein durch einen Ballon in einem der Koronargefäße künstlich herbeigeführter Myokardinfarkt durch die Injektion verschiedener Zellen behandelt werden könnte. Dabei nahm die Größe des Infarktgebietes bei Injektion der Kombination von kardialer und mesenchymaler Stammzellen ab und es war sogar möglich die Herzfunktion (gemessen an der Ejektionsfraktion), deutlich zu steigern [Williams et al., 2013]. In der Neurologie zeigen sich erfolgsversprechende Therapiemöglichkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson oder den multiplen Systematrophien. So konnte die Arbeitsgruppe um Lee zeigen, dass durch den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen eine neuroprotektive Wirkung gegen den dopaminergen neuronalen Zelltod erreicht werden kann und schreiben dem Einsatz dieser Zellen großen Einfluss auf die Therapie des M. Parkinson und der multiplen Systematrophie zu [Lee et al., 2009]. Die Beobachtung der neuroprotektiven Wirkung konnte auch in einer anderen Studie bestätigt werden. So konnte an Ratten bei denen ein dopaminergischer Zellverlust induziert wurde, der Effekt durch Therapie mit hMSC reduziert werden [Park et al., 2008]. Auch aus dem Bereich der Neurologie ist eine Arbeit von Dharmasaroja, der in seinem Review von erfolgsversprechenden Studien berichtet, die an Tieren beispielsweise zu einer Verbesserung der sensomotorischen Funktion nach Stammzelltherapie führten aber auch, dass bei rascher Therapieeinleitung das Infarktvolumen reduziert werden kann [Dharmasaroja et al., 2009]. Ferner können Stammzellen bereits in naher Zukunft bei degenerativen Erkrankungen von besonderer Bedeutung sein, wie anhand der Differenzierungsmöglichkeiten (siehe Abb. 4.) ersichtlich ist. So berichtet Kassem in seiner Übersichtsarbeit von einem lokalen Einsatz z.B. bei Knochendefekten, oder auch von einer systemischen Stammzelltransplantation bei einem Kind mit Osteogenesis imperfecta, das nach dem Eingriff gesunde Kollagenfasern produzieren konnte [Kassem et al., 2008]. Besonders interessant ist hierbei jedoch der Aspekt, dass den mesenchymalen Stammzellen hypoimmunogene Eigenschaften zugeschrieben werden, was vor allem Abstoßungsreaktionen reduzieren könnte [Kassem et al., 2008]. Ferner konnte Koh durch die intraartikuläre



Injektion von humanen mesenchymalen Stammzellen in das Kniegelenk die Symptomatik von Patienten mit Osteoarthritis verbessern und zeigte dabei gleichzeitig eine positive Korrelation zwischen der Menge an injizierten Zellen und dem WOMAC-Score als Vergleichskriterium für den Behandlungserfolg der Osteoarthritis [Koh et al., 2013].

### 1.3. Das elektromagnetische Feld

#### 1.3.1. Grundlagen

Elektromagnetische Felder begegnen uns tagtäglich in unserem Leben. Erzeugt werden sie durch elektromagnetische Wellen zu denen auch Radiowellen, Mikrowellen und sogar das sichtbare Licht zählen (siehe Abb. 7). So produziert auch jedes elektronische Gerät ein eigenes elektromagnetisches Feld. Ein bekanntes und viel diskutiertes Beispiel dafür sind Mobiltelefone, deren Magnetfeld sogar unter Verdacht stand das Risiko für Gehirntumoren zu erhöhen [Cardis et al./Interphone Study Group, 2010].

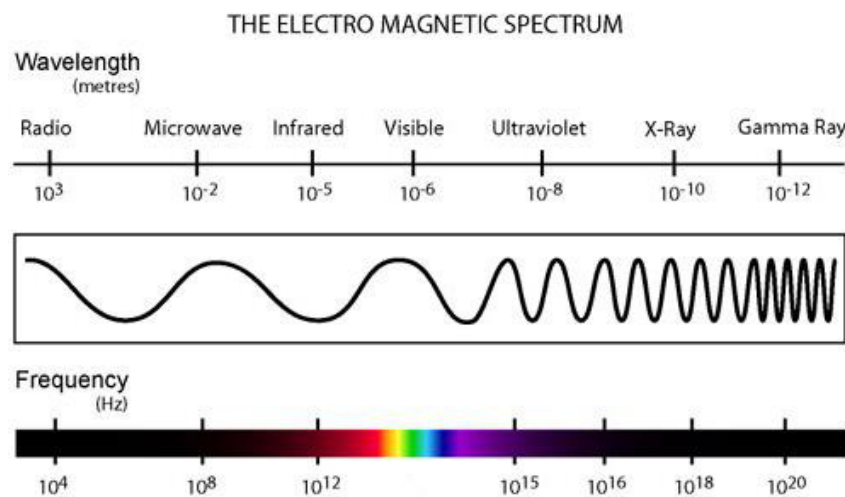
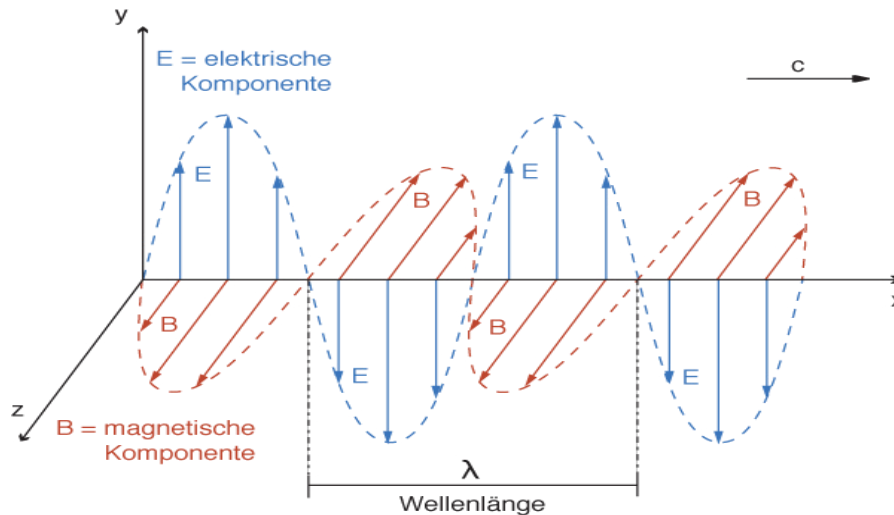


Abb. 7 Übersicht über das elektromagnetische Spektrum (modifiziert)

Physikalisch betrachtet besteht immer eine Kopplung von elektrischen und magnetischen Feldern die senkrecht zueinander verlaufen (siehe Abb. 8). Daher bezeichnet man elektromagnetische Wellen auch als Transversalwellen. Elektromagnetische Wellen bewegen sich mit Lichtgeschwindigkeit und benötigen hierfür im Gegensatz zu Schallwellen kein Medium, das heißt sie sind in der Lage sich auch im Vakuum auszubreiten [Jackson et al., 2006; Maxwell et al., 1865]



**Abb. 8** Darstellung einer elektromagnetischen Welle mit der Kopplung von elektrischen und magnetischen Feldern nach [www.Chemgapedia.de](http://www.Chemgapedia.de)

Die physikalischen Eigenschaften lassen sich anhand von Formeln beschreiben. Notwendig hierfür sind die Wellenlänge  $\lambda$  und die Frequenz  $f$  sowie die Lichtgeschwindigkeit  $c$ .

$$\text{Wellenlänge } \lambda [\text{m}] = \frac{\text{Lichtgeschwindigkeit } c [\text{m/s}]}{\text{Frequenz } f [\text{1/s}]}$$

Im Jahr 1802 führte Thomas Young den sogenannten Doppelspaltversuch durch, bei dem er Licht durch eine Blende mit zwei Spalten fallen ließ. Dahinter befand sich eine Wand, an der das Licht sichtbar werden sollte. Er erwartete dort zwei, den Spalten entsprechende, erleuchtete Areale. Doch entgegen der Vermutung zeigte sich auf der Wand ein diffus verteiltes Lichtmuster [Thomas Young, 1804]. 1927 versuchten Niels Bohr und Werner Heisenberg in der so bezeichneten Kopenhagener Deutung erstmals durch die Quantenmechanik eine mögliche Theorie zum Verständnis dieser und anderer Phänomene, die vermuten ließen, dass Magnetfelder sowohl Wellen- als auch Teilchencharakter haben könnten, zu liefern. Demnach lassen sich manche Effekte durch den sogenannten Dualismus von Welle und Teilchen erklären, bei dem Strahlung mal Wellen-, mal Teilchencharakter haben kann [Faye et al., 2008 ; [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)].

Wichtig für die Wirkung eines Magnetfeldes ist seine Stärke. Diese Stärke lässt sich durch eine physikalische Formel ausdrücken. Wichtige Faktoren hierbei sind zum

einen die Eigenschaften der Magnetspule, nämlich die *Anzahl der Windungen*  $N$  und ihrer *Spulenlänge*  $L$ , sowie die *Stromstärke*  $I$ , die durch die Magnetspule fließt.

$$\text{Feldstärke } H[\text{A/m}] = \frac{\text{Stromstärke } I[\text{A}] \cdot \text{Anzahl der Spulenwindungen } N[1]}{\text{Spulenlänge } l[\text{m}]}$$

Die Eigenschaften der in der Medizin und Forschung eingesetzten Magnetfelder sind nicht einheitlich, sondern unterscheiden sich in diversen Punkten. Ein Hauptpunkt ist die Signalform, die entweder gepulst (PEMF) oder sinusoidal sein kann. Gepulste elektromagnetische Felder sind durch Bursts gekennzeichnet, die sich durch einen raschen Anstieg und einen noch steileren Abfall der Feldstärke in Form von etwa 20 Einzelimpulsen präsentieren. Dahingegen ist der Anstieg und Abfall der Feldstärke bei sinusoidalen Feldern gleichmäßig verteilt. Ein weiterer wichtiger Unterscheidungsfaktor ist die Frequenz des Magnetfeldes.

So ist der mögliche Frequenzbereich wie aus Abb. 7. hervorgeht weit gefächert. Häufig eingesetzte Frequenzbereiche sind der extrem niederfrequente Bereich, der nach WHO-Definition für alle Frequenzen unter 300 Hz gilt [WHO, 1998], sowie der hochfrequente Bereich der in der Literatur mit 100 KHz bis 300 GHz angegeben wird [Vecchia et al., 2009 ; Michelozzi et al., 2002]. Darüber hinaus können bei der Befeldung in elektromagnetischen Feldern noch Parameter wie die Befeldungsdauer, die Stromstärke sowie die Häufigkeit variiert werden. Sofern nicht anders bezeichnet ist in dieser Arbeit mit Magnetfeld immer ein extrem niederfrequentes, sinusoidales Magnetfeld gemeint.

Zahlreiche Arbeiten lassen zudem vermuten, dass die Magnetfelder einen positiven Einfluss auf wichtige Proteine und Faktoren der Chondrogenese haben, was später in dieser Arbeit diskutiert wird.

## 1.4. Die (simulierte) Mikrogravitation

### 1.4.1. Grundlagen

Zunächst einmal ist es wichtig die Begriffe Mikrogravitation und simulierte Mikrogravitation voneinander zu unterscheiden. So versteht man unter Mikrogravitation einen Zustand, bei dem es zu einer Minimierung der Schwerkraft kommt, die zu einer Schwerelosigkeit führt, wie es im Weltraum der Fall ist. Die simulierte Mikrogravitation hebt sich dabei von der normale Mikrogravitation in der Form ab, dass man darunter eine künstlich herbeigeführte Form der Schwerelosigkeit versteht, deren Prinzip auf zwei sich entgegengesetzten Kräften basiert, die sich gegenseitig aufheben. Beispiele für die simulierte Mikrogravitation sind Parabelflüge, welche die Passagiere kurzzeitig schweben lassen, oder entsprechend konstruierte Bioreaktoren, die ebenfalls einen Schwebезustand innerhalb des Systems herbeiführen [Klaus et al., 2007].

Seit Beginn der Raumfahrt gibt es immer wieder Versuche im Weltraum bzw. seit Entwicklung der Mikrogravitationsbioreaktoren auch auf der Erde, um den Einfluss von (simulierter) Mikrogravitation auf Zellen und Zellsysteme zu untersuchen. Die Versuche gehen dabei auf Entdeckungen zurück, die man bei Astronauten machte, die nach Kurz- oder Langzeiteinsätzen aus dem Weltraum zurückkamen.

So wurden eine Atrophie der Muskulatur, das Auftreten von Herzrhythmusstörungen, ein veränderter Orientierungssinn und, für diese Arbeit besonders interessant, auch ein Verlust an Knochenmasse beschrieben [Blaber et al., 2010]. Die Erforschung der Auswirkung von Schwerkraft und (simulierter) Mikrogravitation stellt somit einen für diese Arbeit interessanten Forschungsansatz dar.

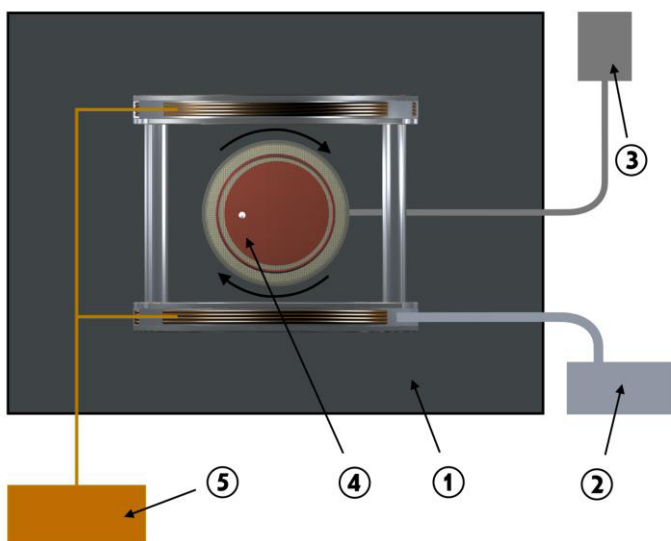
Da man die permanente Schwerelosigkeit nur im Weltraum vorfindet und ein Shuttlestart und -einsatz mit immensen Kosten verbunden ist, wurde nach einer Möglichkeit gesucht einen ähnlichen Effekt auf der Erde zu erzeugen, mit dem Ziel die Wirkung der Schwerelosigkeit auf Zellen und Organismen effizienter und rentabel untersuchen zu können. Dies scheint durch den Einsatz von sich rotierenden Bioreaktoren, die auch als RCVS (Rotatory Cell Vessel System), RCCS (Rotatory Cell Culture System), RWV (Rotatory Wall Vessel) oder Clinostat bezeichnet werden, möglich. Zwar unterscheiden sich die verschiedenen Systeme voneinander, doch das grundlegende Funktionsprinzip ist in allen Varianten gleich und wird unter Punkt 2.5. näher beleuchtet.

### 1.4.2. Schwierigkeiten mit dem kommerziellen RCCS

Bei dem Originalsystem von Synthecon ist das Bioreaktorgefäß direkt am Gehäuse befestigt, in dem sich auch der Motor befindet. Bei diesem handelt es sich um einen Gleichstrommotor, der seine Bewegungsenergie durch starke Magnete erzeugt. Vor Versuchsbeginn konnten wir feststellen, dass dabei ein statisches Magnetfeld in einem Bereich von 0,3-0,5 mT entsteht. Durch die Drehbewegung wird das statische Feld zusätzlich von einem Wechselfeld überlagert, das von der Drehgeschwindigkeit des Motors abhängt. Durch die Nähe der Zellen zum Motor und somit die gegebene Exposition zu dessen Magnetfeld haben wir in Zusammenarbeit mit der „Neuen Magnetodyn GmbH“ eine alternative Lösung für dieses Problem entwickelt, um eine Interaktion durch das ungewollte Magnetfeld mit dem von uns gezielt eingesetzten EMF zu verhindern. Durch diese Umgestaltung des Systems ergab sich ein leicht abgewandelter Versuchsaufbau im Vergleich zum Standardsystem, der im Folgenden erläutert werden soll.

### 1.5. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau bestand aus einem Brutschrank, in diesem befand sich der Bioreaktor mit Medium und Zellpellet. Der Bioreaktor war über eine biegsame Welle mit einem extern gelegenen Motor verbunden. Durch diesen war es möglich via Steuerungskonsole die genaue Umdrehungsgeschwindigkeit festzulegen. Oberhalb und unterhalb des Bioreaktors befand sich jeweils eine Magnetfeldspule, die in ein Gehäuse aus Plexiglas eingebettet und von Wasser umgeben war, sodass der Bioreaktor im Zentrum der beiden Spulen stand. Die Gehäuse aus Plexiglas waren mit einem Kühlgerät verbunden und sorgten für einen Wärmeschutz vor den sich erwärmenden Magnetfeldspulen.



**Abb. 9** Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus (1) Bioreaktor, (2) Pumpe der Wasserkühlung, (3) Motor und Steuerungseinheit, (4) Bioreaktorgefäß mit exemplarischem Zellpellet, (5) Magnetfeldgenerator

### 1.6. Fragestellung

Bei der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen ist die terminale Zellhypertrophie der Stammzellen mit einer Kalzifikation der Matrix ein bekanntes und unerwünschtes Problem [Shintani et al., 2013].

Ein neuer Ansatzpunkt um dieser ungewollten Entwicklung entgegenzuwirken ist der Einsatz der Mikrogravitation, da gezeigt werden konnte, dass Schwerelosigkeit in der Lage ist die osteogene Differenzierung zu blockieren [Sheyn et al., 2010 ; Zayzafoon et al., 2004] und womöglich die chondrogene steigern kann [Wu et al., 2013]. Da bislang die Kombination dieser beiden Methoden in der Literatur noch nicht erwähnt wurde, soll die Effektivität dieser im Rahmen meiner Doktorarbeit erörtert und gleichzeitig ein Blick auf die Auswirkung der einzelnen Methoden geworfen werden. Ziel ist es die folgenden, sich stellenden Fragen, zu beantworten:

- a) Welchen Einfluss hat die simulierte Mikrogravitation auf humane mesenchymale Stammzellen unter elektromagnetischer Stimulation auf die chondrogene Differenzierung?
- b) Welchen Einfluss hat die simulierte Mikrogravitation auf humane mesenchymale Stammzellen unter elektromagnetischer Stimulation auf die terminale Hypertrophie?
- c) Lassen sich die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Wirkung von elektromagnetischen Feldern auf die chondrogene Differenzierung von HMSC validieren?

## 2. Material und Methoden

Im Folgenden sind zunächst die verwendeten Materialien, Geräte sowie die eingesetzte Software aufgelistet. Im Anschluss werden die Methoden, die in dieser experimentellen Doktorarbeit verwendet wurden, explizit dargestellt.

### 2.1. Verwendete Materialien

#### 2.1.1. Verwendete Geräte und Instrumente

<b>Agilent Bioanalyzer (2100)</b>	Agilent(Santa Clara, USA)
<b>Analysewaage</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Autoclav</b>	H + P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
<b>Bioreaktortrieb</b>	Neue Magnetodyn GmbH (München, Deutschland)
<b>Brutschrank</b>	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
<b>Computer</b>	Fujitsu Siemens (München, Deutschland)
<b>Flexible Welle</b>	Neue Magnetodyn GmbH (München, Deutschland)
<b>Gefrierschrank (- 20°C)</b>	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
<b>Gefrierschrank (- 80°C)</b>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
<b>GeneChip Fluidics Station (450)</b>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<b>GeneChip Hybridization Oven (640)</b>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<b>GeneChip Scanner (3000 7G)</b>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<b>Kryotom (CM 3050)</b>	Leica (Schalksmühle, Deutschland)
<b>Kryotommesser</b>	Jung (Heidelberg, Deutschland)
<b>Kühlgehäuse für Magnetspulen</b>	Neue Magnetodyn GmbH (München, Deutschland)
<b>Kühlschrank (+4°C)</b>	Liebherr (Bulle, Schweiz)
<b>Kühlzentrifuge (5417R)</b>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>Kühlzentrifuge (Multifuge 1L-R)</b>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
<b>Lichtmikroskop (Axioskop 40)</b>	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
<b>Lichtmikroskop (Axiovert 40 CFL)</b>	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
<b>Lightcycler (2.0)</b>	Roche Diagnostic (Mannheim, Deutschland)

<b>Lightcycler-Zentrifugenadapter</b>	Roche Diagnostic (Mannheim, Deutschland)
<b>Magnetfeldgenerator</b> (Magnetodyn M80)	Neue Magnetodyn GmbH (München, Deutschland)
<b>Magnetspulen</b>	Neue Magnetody GmbH (München, Deutschland)
<b>Mikro-Dismembrator</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	Karl Hecht Assistenet (Altnau, Schweiz)
<b>PCR-Analysegerät</b> (Fluor-S™ Multimager)	Biorad (München, Deutschland)
<b>PCR-Maschine (DNA engine)</b>	Biorad (München, Deutschland)
<b>pH-Meter (HI-122)</b>	Hanna Instruments (Whoonsocket, USA)
<b>Photometer (Gen Quant II)</b>	Pharmazia Biotech (Cambridge, England)
<b>Pipettierhilfe elektrisch</b> (acu-jetR pro)	Brand (Wertheim, Deutschland)
<b>Sterilbank (Hera safe)</b>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
<b>Stickstofftank</b>	Cryotherm (Kirchen/Sieg, Deutschland)
<b>T3 Thermocycler</b>	Biometra(Göttingen, Deutschland)
<b>Temperatursensor</b>	Neue Magnetodyn GmbH (München, Deutschland)
<b>Temperatursteuerung (DC50)</b>	ThermoHaake (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Umwälzkühlsystem (V15)</b>	ThermoHaake (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Vortex-Genie™</b>	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
<b>Wasserbad (TW20)</b>	Julabo (Seelbach, Deutschland)

### 2.1.2. Verwendete Software

<b>Axiovision 4</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
<b>Endnote X7</b>	Thomson Reuters(New York, USA)
<b>LabView</b>	National Instruments Corp. (Austin, USA)
<b>Microsoft Office 2007, 2010</b> (Excel, Word, PowerPoint)	Microsoft Corp. (Redmond, USA)
<b>Microsoft Paint</b>	Microsoft Corp. (Redmond, USA)
<b>MultiMes</b> Messwetterfassung und -verarbeitung	Konrad Schneider Software-Entwicklung (Greiding, Deutschland)



<b>PhotoScape 3</b>	Mooii Tech Co., Ltd. (Cheonan-si, Südkorea)
<b>Prism 5.02</b>	GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
<b>Roche Lightcycler Software</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>ArrayQualityMetrics 3.12.0</b>	Bioconductor

### 2.1.3. Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Abdecktücher steril (Secu-Drape)</b>	Sengewald (Rohrdorf-Thansau, Deutschland)
<b>BacilloI AF</b>	Bode Chemie (Hamburg, Deutschland)
<b>BD Discardit II Spritze (10ml)</b>	Becton, Dickinson and Company (New Jersey, USA)
<b>BD Plastipak Spritze (20ml)</b>	Becton, Dickinson and Company (New Jersey, USA)
<b>Bechergläser</b>	Schott Duran (Mainz, Deutschland)
<b>Breath Easy®</b> Gas permeable sealing membrane for microtiter plates	Diversified Biotech (Dedham, USA)
<b>CombiStopper Verschlusskoneen steril</b>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
<b>Costar Stripette (5ml,10ml,25ml)</b>	Corning Inc. (New York, USA)
<b>Cryo Tube™ Vials</b>	Nunc (Kamstrupvej, Dänemark)
<b>Deckgläser</b>	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
<b>Dismembrator Kugeln (0,9mm)</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Dismembrator Tubes</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Eppendorf Gefäße</b>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>Erlenmeyer Kolben</b>	Schott Duran (Wertheim, Deutschland)
<b>Falcon klein (15ml)</b>	TPP (Trasadingen, Schweiz)
<b>Falcon Röhrchen groß (50ml)</b>	Beckton Dickson Labware (Le point de Claix, Frankreich)
<b>Falconständer</b>	TPP (Trasadingen, Schweiz)
<b>Faltenfilter, qualitativ (185 mm)</b>	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Fermacidal D2</b>	IC Products SA (Minusio, Schweiz)
<b>Flüssiger Stickstoff</b>	Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)
<b>Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand (0,2µm)</b>	Whatman (Clifton, USA)

<b>Gigasept R AF</b>	Schülke&Mayr (Norderstedt, Deutschland)
<b>Lightcycler-Kapillaren</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>Objektträger Superfrost® plus</b>	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
<b>Parafilm "M"</b>	Pechiney – Plastic Packaging (Chicago USA)
<b>Pinzette steril</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Pipettenspitzen Diamond (DL10,D200,D1000)</b>	Gilson (Middleton, USA)
<b>RCVS-Vessel (10ml)</b>	Synthecon Inc. (Houston, USA)
<b>RNaseZAP™ RNase-Entfernungsspray</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Schere steril</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Tissue Tek® Cryomold Einbetttschälchen Biopsy (10 x 10 x 5 mm)</b>	Sakura (Zoeterwoude, Niederlande)
<b>Tissue-Tek</b>	Sakura (Zoeterwoude, Niederlande)
<b>QuantiTect Rev. Transcription Kit</b>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<b>Untersuchungshandschuhe (Peha-soft®, powderfree)</b>	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
<b>Wägepapier (9 x 11,5 cm)</b>	Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
<b>Zefastabil</b>	Zefa Laborservice GmbH(Harthausen, Deutschland)
<b>Zellkulturflaschen einfach</b>	Nunc (Kamstrupvej, Dänemark)
<b>Zellkulturflaschen Tripple</b>	Nunc (Kamstrupvej, Dänemark)

#### 2.1.4. Verwendete Chemikalien

<b>Aceton</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Alzianblau</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Ampuwa® Spüllösung Aqua dest. (10l)</b>	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland)
<b>Aqua dest. ad iniectabilia (1000ml)</b>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
<b>Aquatex</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Brij</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Chloroform</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Chondroitin-6-Sulfat</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Chondroitinase</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Essigsäure</b>	VWR International(Leuven, Belgien)
<b>Ethanol</b>	Apotheke Klinikum Innenstadt(München, Deutschland)
<b>Eukitt</b>	O. Kindler (Freiburg, Deutschland)
<b>Fast Green</b>	Waldeck GmbH (Münster, Deutschland)
<b>Hämalaun nach Meyer Lösung</b>	Apotheke Klinikum Innenstadt(München, Deutschland)
<b>Isopropanol</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Kernechtrot</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>PBS</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>Roti-Histol</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Safranin-O</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Salzsäure 1 molar</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Succrose</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Toluidinblau</b>	Waldeck GmbH (Münster, Deutschland)
<b>Tris-Puffer</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Trypanblau</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>Trypsin/EDTA</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>Tween 20</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Wasserstoffperoxid 30%</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Xylol</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.5. Verwendete Medien, Zusätze sowie Antikörper und Seren

<b>Amphotericin B</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Bovines Serum Albumin</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Collagen II Antikörper (aus der Maus)</b>	Dept.of Medical & Physiological Chemistry (University of Uppsala , Schweden)
<b>Dexamethason</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Merck ( Darmstadt, Deutschland)
<b>Fetales Kälberserum</b>	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
<b>FGF-2</b>	PeproTech (Rocky Hill, USA)
<b>ITS+1 Liquid Media</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>L-Ascorbat-2-Phosphat</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>L-Glutamin</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>L-Prolin</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Maus-Antikörper (aus der Ziege)</b>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<b>MEM-Aminosäuren</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>TGF-β3</b>	R&D Systems (Abungdon, United Kingdom)
<b>Ziegenserum</b>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

<b>Chondrozyten-Medium</b>	
Ham's F-12 Medium	
Penicillin/Streptomycin Mix	50 IU/ml
FCS	10%
Amphotericin B	2,5 mg/ml
MEM-Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1%
Ascorbinsäure	25 µl/ml

<b>HMSC-Medium</b>	
Alpha Medium	
Penicillin/Streptomycin Mix	40 IU/ml
FCS	10%
L-Glutamin	2 mM
FGF-2 (FGF-basic)	5 ng/ml

<b>Chondrogenes Differenzierungsmedium</b>	
DMEM	
Penicillin/Streptomycin	40 IU/ml
Dexamethason	0,1 $\mu$ M
L-2-Ascorbat-2-Phosphat	0,195 mM
L-Prolin	0,35mM
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x) (Insulin, Transferin, Natriumselenit, BSA, Linolsäure)	
ggf. TGF- $\beta_3$	10ng/ml

<b>Chondrozyten Einfriermedium</b>	
Chondrozyten-Medium	70 %
FCS	20 %
DMSO	10 %

<b>HMSC Einfriermedium</b>	
HMSC-Medium	85 %
FCS	5 %
DMSO	10 %

### 2.1.6. Verwendete Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer stammen von Metabion (Martinsried, Deutschland) und wurden von uns in Gefrierschränken bei -20° C gelagert.

<b>Gen</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Literatur</b>
<b>GAPDH</b> Housekeeping Gen	Sense: 5' - TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC - 3' Antisense: 5' - GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG - 3'	Vandesompele et al. (2002)
<b>Aggrekan</b>	Sense: 5' - CAG CAC CAG CAT CCC AGA - 3' Antisense: 5' - CAG CAG TTG ATT CTG ATT CAC G - 3'	Varas et al. (2007)
<b>Kollagen II alpha 1</b>	Sense: 5' - GTT ATC GAG TAC CGG TCA CAG AAG -3' Antisense: 5' - AGT ACT TGG GTC CTT TGG GTT TG -3'	Varas et al. (2007)
<b>Kollagen X</b>	Sense: 5'- CAA GGC ACC ATC TCC AGG AA - 3' Antisense: 5'- AAA GGG TAT TTG TGG CAG CAT ATT - 3'	Zhang et al. (2010)
<b>SOX-9</b>	Sense: 5' - AGA CCT TTG GGC TGC CTT AT - 3' Antisense: 5' - TAG CCT CCC TCA CTC CAA GA - 3'	Vandesompele et al. (2002)

## **2.2. Verwendete Zellen**

Im Rahmen des gesamten Versuches kamen 2 Zellarten zum Einsatz. Anfangs wurden zur Erprobung der technischen Grundlagen und Methoden Chondrozyten benutzt. Nachdem die erforderlichen Vorversuche abgeschlossen waren, konnte der geplante Versuch mit Stammzellen gestartet werden.

### **2.2.1. Chondrozyten**

In den Vorversuchen wurden Chondrozyten verwendet um verschiedene Aspekte des Versuchsaufbaus, wie später unter 3.1. näher erläutert, zu beleuchten. Bei den Zellen handelt es sich um humane Chondrozyten, die von einem 17 Jahre jungen, kaukasisch-stämmigen und ohne Nachweis von Erkrankungen verstorbenen Patienten stammen. Für die Verwendung der Zellen liegt ein Ethikantrag der Abteilung für Rechtsmedizin vor.

### **2.2.2. Humane Mesenchymale Stammzellen (HMSC)**

In den eigentlichen Versuchen wurde mit Stammzellen der Firma LONZA gearbeitet. Die verwendeten Stammzellen waren alle von Spender #8F3434, einem 22 Jahre altem, kaukasisch stämmigen, gesunden Mann und wurden in Passage 2 tiefgefroren geliefert. Die Zellen wurden unter Einhaltung der Kühlkette nach Erhalt der Lieferung sofort in Stickstoff weggefroren und bei Bedarf in entsprechender Menge kultiviert und letztlich in Passage 5 ausgewertet. Ein Vial mit gefrorenen humanen mesenchymalen Stammzellen enthält bei Lieferung laut Herstellerangaben mindestens 750 000 Stammzellen in P2.

Der Hersteller gibt im so genannten „Certificate on Analysis“ eine 92 % Viabilität der Zellen sowie negative Testergebnisse für HIV, Hepatitis B und C Viren an. Lonza bestätigt auch die Fähigkeit der Zellen, sich in die entsprechenden Gewebesubtypen zu differenzieren. Diese Multipotenz der HMSC dieses Spenders wurde darüber hinaus bereits im Labor nachgewiesen [Mayer-Wagner et al., 2011].

## 2.3. Zellkultur

Im Folgenden wird die Durchführung der einzelnen Schritte der Zellkultur, die für diese Arbeit von Bedeutung waren, näher beschrieben. Alle Schritte der Zellkultur wurden, sofern nicht anders erwähnt, unter Beachtung von Sterilität unter einer Sterilbank durchgeführt.

Neue Zellen wurden nach Erhalt direkt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren, bei Beginn des entsprechenden Versuches wieder aufgetaut und zur Vermehrung in Monolayer-Kulturflaschen aufgeteilt. Bei einer Konfluenz von etwa 70-80 %, in der Regel also nach etwa 14 Tagen, wurden die Zellen in die Pelletkultur überführt und dann im weiteren Verlauf entsprechend der zugeteilten Versuchsgruppe stimuliert, ehe sie am letzten Tag geerntet und zur Auswertung weiterverarbeitet wurden. Diese Schritte sollen im Folgenden vertieft werden.

### 2.3.1. Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die Kryokonservierung spielt bei der Aufbewahrung von Zellen eine wichtige Rolle, da die Zellen hierbei über längere Zeit aufbewahrt und bei Bedarf in geeigneter Menge aufgetaut werden können.

Die Zellen wurden vom Hersteller in einem Vial verpackt und in Trockeneis gefroren geliefert und von uns umgehend in einem Stickstoff-Tank deponiert, um die Kühlkette aufrecht zu erhalten.

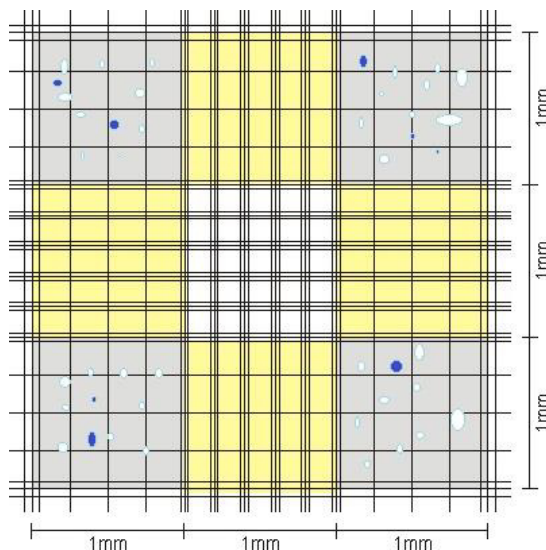
Nach dem ersten 14-tägigen Kultivierungszyklus der frisch gelieferten Zellen wurden diese zu etwa 240 000 Zellen pro Vial in Passage 3 in einem mit DMSO angereichertem Stammzell-Einfriermedium eingefroren und vor Durchführung eines Versuches aufgetaut. Überschüssige Zellen aus der Zellkultur wurden in Einfriermedium in einem Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Diese Zellen wurden jedoch nicht für diese Doktorarbeit verwendet.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen aus dem Stickstofftank oder dem Gefrierschrank kurz in der Hand gewärmt und in ein Falcon gegeben, das auf 5ml Medium aufgefüllt wurde. Die definierte Menge von 5 ml erlaubt eine Hochrechnung der gesamten Zellzahl durch die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.

### 2.3.2. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden zunächst 10µl der Zelllösung (aus dem Falcon mit 5ml) mit 10µl Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau hat die Eigenschaft beschädigte Zellen anzufärben und eignet sich somit zur mikroskopischen Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen [Schrek et al., 1936].

10µl dieses Zelllösung-Trypanblau-Gemisches wurden nun in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Gezählt wurden die nicht blau gefärbten Zellen in den 4 Hauptkammern (siehe Abb. 10.). Durch die unten angegebene Formel war somit die Zellzahlbestimmung pro Milliliter möglich. Dieser Wert wurde mit fünf multipliziert um die Anzahl der Zellen auf 5ml Zelllösung hoch zu rechnen.



**Abb. 10** Schematisch dargestelltes mikroskopisches Bild beim Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer

Berechnung der Zellzahl in der Neubauer-Kammer:

$$N = \frac{n}{4} \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot V$$

- N = Zellzahl gesamt
- n = Gezählte Zellzahl in den 4 Quadranten
- V = Volumen der gesamten Zellsuspension (5 ml)
- /4 Da zur weiteren Berechnung nur die durchschnittliche Zellzahl pro 1x1 mm Feld benötigt wird, teilt man den Gesamtwert durch 4.
- 2 Berücksichtigung der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau
- 10<sup>4</sup> Hiermit wird die Zellzahl in 1ml Zellsuspension berechnet

### 2.3.3. Kultivierung und Vervielfältigung der Zellen im Monolayer

Nach dem Auszählen wurden die Zellen in Monolayerkulturflaschen mit einer Dichte von 80 000 Zellen / 25 cm<sup>2</sup> kultiviert. Hierfür wurden die entsprechende Menge der Zelllösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit Medium auf 25 ml aufgefüllt. Diese 25 ml mit den etwa 80 000 Stammzellen wurden anschließend mit



12,5 µl des Wachstumsfaktors FGF-2 (5 ng/ml) angereichert. Die Kultivierung erfolgte über 14 Tage bei 37°C in einem Brutschrank. Das Medium wurde dabei alle 2 Tage gewechselt. Dazu wurde zunächst das alte Medium abpipettiert und verworfen, ehe es durch 25 ml frisches Stammzellmedium, angereichert mit 12,5 µl FGF-2 (5 ng/ml), ersetzt wurde.

Die Stimulation mit 5 ng/ml FGF-2 in der Kultivierungsphase erfolgte, da in der Literatur ein erhöhtes chondrogenes Potential der humanen mesenchymalen Stammzellen mit vermehrter Proteoglykanbildung beschrieben wird [Solchaga et al., 2005].

Nach Ablauf der 14 Tage wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen mit einer Pipette entfernt und anschließend 10 ml PBS in die Kulturflasche geben um Medium- und Zellproduktreste zu entfernen, da diese das im nächsten Schritt benötigte Trypsin/EDTA inaktiveren könnten. Die Zugabe von Trypsin/EDTA (10 ml/25 cm<sup>2</sup>) bewirkte nach etwa 3 Minuten eine enzymatische Lösung der adhärennten Zellen von der Plastikoberfläche, sodass diese frei in der Trypsin/EDTA-Lösung schwammen und somit aus der Kulturflasche extrahiert werden konnten. Hierfür wurde nach Ablauf der 3 Minuten die Enzymaktivität durch Zugabe von 10ml Medium gestoppt und das Gemisch in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abpipettiert. Es folgte die Trennung der festen Zellanteile vom Flüssiganteil in der Zentrifuge bei 1500U/min für 5 Minuten. Der Überstand aus Medium und Trypsin/EDTA wurde abgegossen und anschließend wurden, wie unter 2.3.2 beschrieben, 5ml Medium hinzugegeben und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Dieser Kultivierungsschritt wurde bei den Zellen, die in P2 geliefert wurden, erneut durchgeführt, um eine ausreichende Zellzahl für die Pelletkultur in P5 zu erreichen.

#### **2.3.4. Pelletkultur**

Die Zelldifferenzierung wurde in Form einer Pelletkultur durchgeführt, da diese 3 dimensionale Kultivierungsform den *in vivo* Bedingungen näher kommt, als die Monolayer-Kultivierung in einer Mediumflasche.

Zum Ansetzen der Pelletkultur wurden die Zellen wie unter 2.3.1. beschrieben aus Passage 4 gelöst und ausgezählt. Für ein Pellet wurden 400 000 Zellen mit 1 ml Differenzierungsmedium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, das je nach Gruppe ggf. auch noch mit 0,5 µl TGF-β<sub>3</sub> (10 ng/ml) versehen war. Die Falcons wurden dann für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und anschließend für 2 Tage in einem

Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach Abschluss dieser 2 Tage hatte sich die flache Zellschicht am Boden der Falcons zu kugelförmigen Zellpellets organisiert. Diese wurden dann in Eppendorfgefäße mit je 1 ml Medium (ggf. mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3) transferiert. Die Gruppen, die mit der Mikrogravitation stimuliert werden sollten, wurden am 14. Tag der Pelletkultur in das Bioreaktorgefäß mit 10 ml Medium überführt und darin für die restlichen 7 Tage kultiviert. Die Zellen ohne Mikrogravitation wurden weiterhin unter denselben Bedingungen wie zuvor kultiviert. Je nach Gruppe erfolgte ab dem 2. Tag eine zusätzliche Stimulation im EMF.

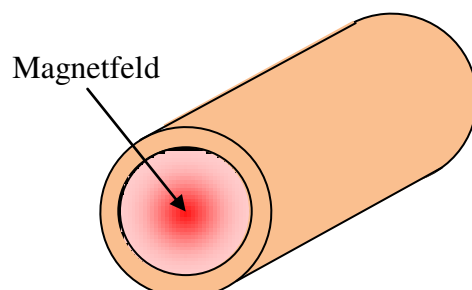
Um sowohl den Gasaustausch als auch einen Schutz für die Pellets in den Eppendorfgefäßen zu gewährleisten, wurden die Deckel mit einer sterilen Schere entfernt und die Gefäße in einen speziellen Gefäßständer gestellt, der mit einer semipermeablen Membran abgeklebt wurde. Diese Membran wurde bei jedem Mediumwechsel getauscht.

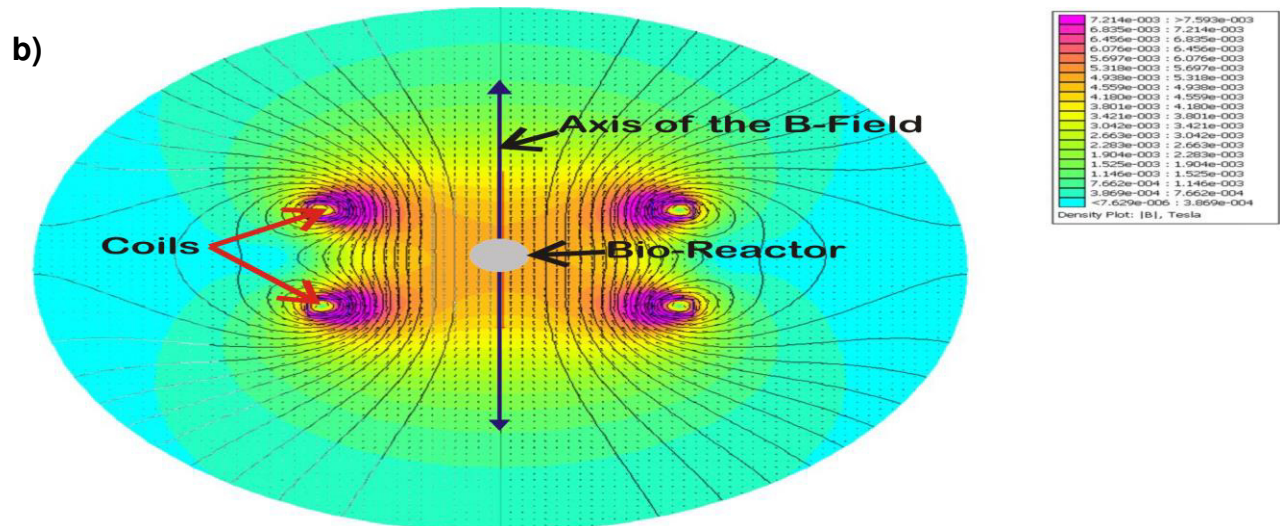
#### 2.4. Stimulation im Magnetfeld

Wichtig für den Versuch war die Erzeugung eines möglichst homogenen Magnetfeldes mit konstanten Eigenschaften. Grundsätzlich standen für diesen Versuch zwei Anordnungen zur Magnetfelderzeugung zur Auswahl. Zum einen eine Solenoid-Spule, bei dem sich die Magnetspule zirkulär um einen zylindrischen Körper orientiert und dabei innerhalb des Körpers ein Magnetfeld erzeugt (siehe Abb. 11a) und zum anderen eine Helmholtz-Anordnung (siehe Abb. 11b). Hier handelt es sich um zwei Magnetspulen, die in einem definierten Abstand parallel zueinander angeordnet werden. Jede Magnetspule für sich allein genommen erzeugt zwar ein inhomogenes Magnetfeld, doch durch die Überlappung beider Felder entsteht ein homogenes Feld.

Da beide Anordnungen gleichermaßen in der Lage sind ein homogenes Magnetfeld zu produzieren, aber das offene System der Helmholtz-Anordnung eine bessere Unterbringung und Bedienbarkeit des Bioreaktors innerhalb des Brutschrankes ermöglicht, wurde dieses System bei unserem Versuch bevorzugt.

a)





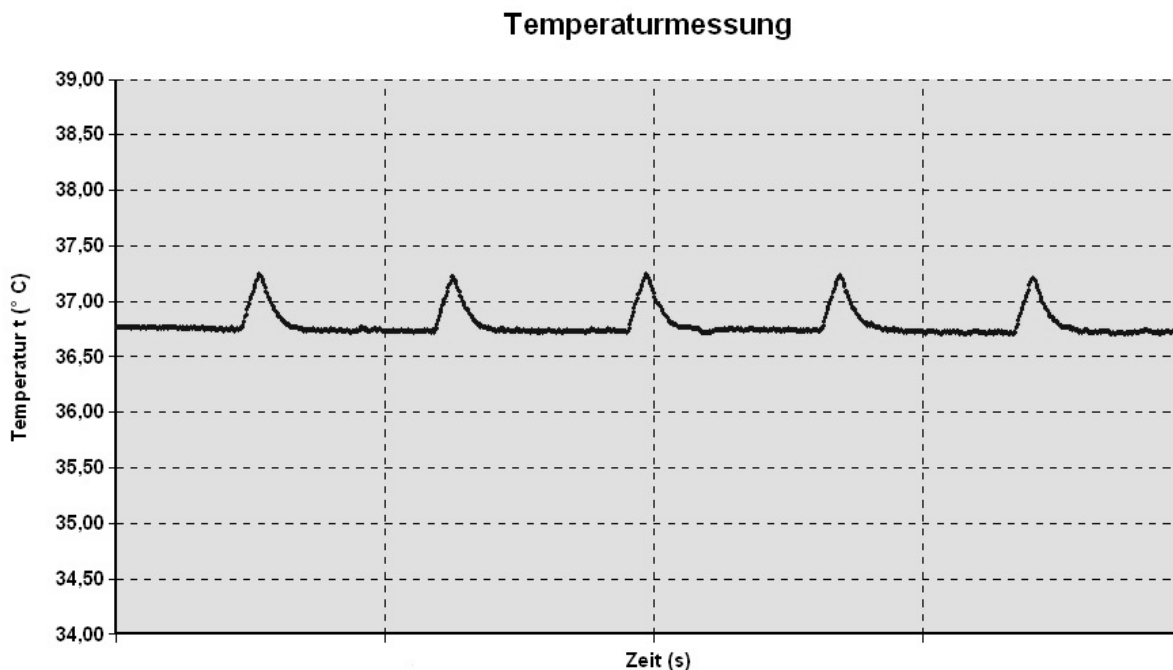
**Abb. 11** Vergleich von 2 möglichen Magnetfeldanordnungen  
 a) Zirkulär angeordnete Magnetspule (=Solenoid-Spule)  
 b) Helmholtz-Anordnung

Das Magnetfeld wurde durch den Funktionsgenerator M80 der Firma Magnetodyn, der auch im klinischen Bereich Einsatz findet, erzeugt. Die Steuerung des Magnetfeldes erfolgte über das Computerprogramm LabView. Dieses Programm erlaubt es wichtige physikalische Eigenschaften, die für die Magnetfeld-Generierung von großer Bedeutung sind einzustellen (siehe Tab. 2.). Die Stimulation von HMSC im elektromagnetischen Feld innerhalb einer Solenoid-Spule war eine bereits bekannte Methode im Labor und wurde in früheren Versuchen bereits etabliert [Mayer-Wagner et al., 2011]. Hierbei erwiesen sich folgende Setup-Parameter als besonders günstig für die chondrogene Differenzierung (siehe Tab. 2.) und wurden dementsprechend auch in dieser Arbeit verwendet. Die Etablierung des Magnetfeldes in der Helmholtzanordnung war wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

<b>Frequenz f</b>	15 Hz
<b>Magnetfeldstärke H</b>	5 mT
<b>Effektive Stromstärke I</b>	4,2 A
<b>Befeldungsdauer</b>	3x45 Minuten pro Tag
<b>Feldart</b>	Sinus

**Tab. 2** Magnetfeldeigenschaften

Die Aktivierung eines Magnetfeldes führt zu einem Stromfluss durch die Magnetspulen, wodurch eine deutliche Temperaturerhöhung im Bereich der Spulen erzeugt wird. Um die Zellen nicht durch zu hohe Temperaturen oder zu starke Temperaturschwankungen zu beeinflussen, wurde ein Kühlsystem der Firma Haake installiert, das für möglichst konstante Temperaturen im Bereich von  $37 \pm 0,25 \text{ }^\circ$  innerhalb des Magnetfeldes sorgte (siehe Abb. 12.).



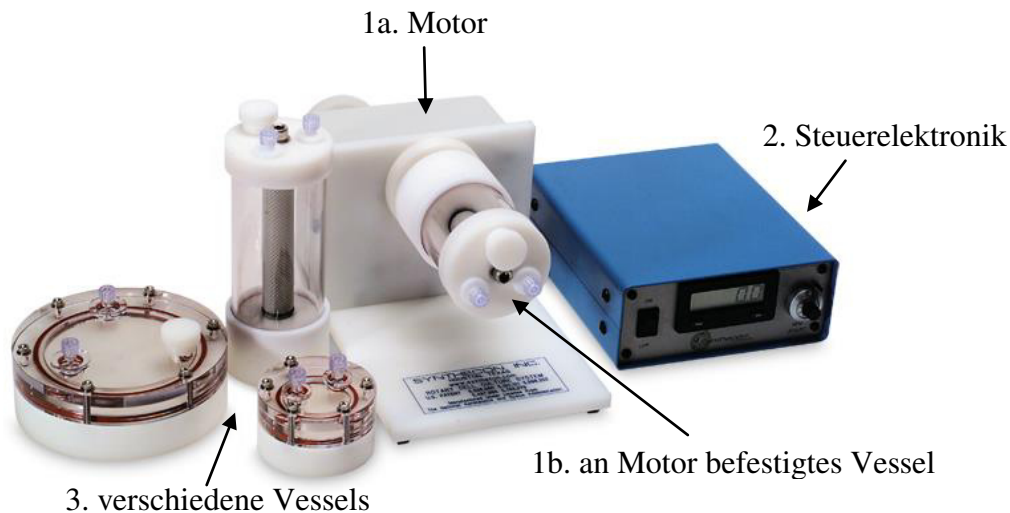
**Abb. 12** Ausschnitt des Temperaturverlaufes über fast 2 Tage während eines Versuches. Die Temperatur bewegt sich während des Versuches bei  $37^\circ \pm 0,25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Peaks entstehen durch die intermittierende Aktivierung des Magnetfeldes, durch das Energie in Form von Wärme abgegeben wird.

## 2.5. Simulierte Mikrogravitation

### 2.5.1. Erzeugung der simulierten Mikrogravitation

Grundlage für die simulierte Mikrogravitation sind Forschungsarbeiten der NASA, die einen Bioreaktor entwickelte, der in der Lage ist durch Rotation die im Inneren des Bioreaktors wirkenden mechanischen Kräfte auf darin befindliche Proben zu reduzieren [Hammond & Hammond, 2002]. Es stellte sich heraus, dass mit dem Schwebezustand bei Abwesenheit von Turbulenzen und geringen Scherkräften in diesem System, wichtige Eigenschaften der Schwerelosigkeit erfüllt sind [Schwarz et al., 1992].

Das ursprüngliche System wird mittlerweile unter Lizenz der NASA durch die Firma Synthecon kommerziell vertrieben [Ingram et al., 1992]. Das kommerzielle RCCS besteht aus 3 Hauptkomponenten (siehe Abb. 2.5.)



**Abb. 13** RCCS der Firma Synthecon bestehend aus einem Motor, und einem direkt damit verbundenen Vessel sowie der Steuerelektronik-Einheit zur Regulierung der Umdrehungsgeschwindigkeit.

Das Prinzip des Systems besteht darin, dass ein Motor (Abb. 13. 1a) eine gleichmäßige Rotationsbewegung des damit verbundenen Hohlgefäßes (Abb. 13. 1b) generiert. Die durch die Rotation erzeugte Kraft wirkt der Schwerkraft entgegen (siehe Abb. 14.) und führt damit bei entsprechender Stärke zu einem Schwebezustand des im Hohlgefäß befindlichen Körpers. Da die Körper, die in einen Schwebezustand versetzt werden sollen nicht einheitlich sind, sondern sich durch verschiedene Werte in Größe, Dichte und Masse unterscheiden, ist es erforderlich die Drehgeschwindigkeit variabel einstellen zu können. Dies gelingt durch eine Steuerungselektronik (Abb. 13. 2.) mit der man die Möglichkeit hat die Umdrehungen pro Minute zu adjustieren.

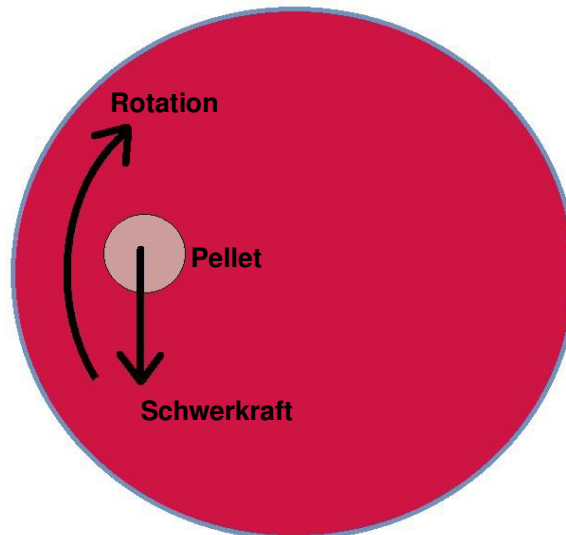


Abb. 14 Prinzip der simulierten Mikrogravitation und Darstellung der physikalischen Kräfte

Zum Verständnis des Prinzips ist es wichtig zu wissen, dass das Verhalten der Pellets innerhalb des Systems im Wesentlichen durch drei physikalische Einflussfaktoren bestimmt wird [Hammond & Hammond, 2001]:

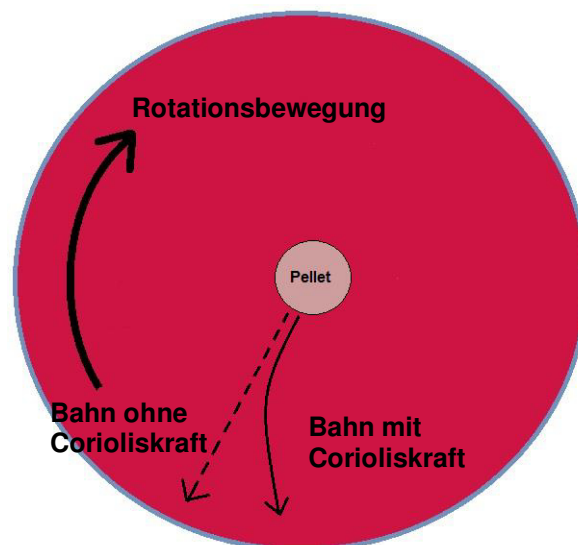
1. Sedimentationsgeschwindigkeit und Scherkräfte
2. Coriolis- und Zentrifugalkraft
3. Massentransporteffekte

Die durch diese Rotationsbewegung entstehenden Scherkräfte werden bei laminarer Strömung durch das im Vessel befindliche Medium gedämpft. Aus Versuchen mit Säugetierzellen weiß man, dass der kritische Wert für die Scherkräfte bei etwa 3-10 dyn/cm<sup>2</sup> liegt. Ab diesen Werten kann es von Zellschäden bis zum Zelltod kommen [Guidi et al., 2002] Die auf ein Pellet wirkende Scherkraft wurde in Zusammenarbeit mit der „neuen Magnetodyn GmbH“ beispielhaft anhand von Probepellets berechnet und liegt bei etwa 1,6 dyn/cm<sup>2</sup>.

$$T_{\max} = \frac{3\mu \cdot V_{\text{Pellet}}}{2r_{\text{Pellet}}}$$

- $T_{\max}$  = maximal auf das Pellet wirkende Scherkraft (1,6 dyn/cm<sup>2</sup>)  
 $\mu$  = Viskosität des Kulturmediums (1,05 kg/ms)  
 $V_{\text{Pellet}}$  = Sedimentationsgeschwindigkeit des Pellets (0,04 m/s)  
 $r_{\text{Pellet}}$  = mittlerer Pelletradius (0,40 mm)

Die Corioliskraft hingegen ist eine Kraft die in Verbindung mit der Zentrifugalkraft steht. Während die Zentrifugalkraft dafür sorgt, dass sich das Pellet von der Mitte weg bewegt und am Rand des Gefäßes eine feste Position einnimmt; ist die Corioliskraft die Kraft die dafür sorgt, dass das Pellet auf diesem Weg nach außen keine gerade Strecke zurücklegt, sondern in einer gekrümmten Bahn an den Rand des Gefäßes gelangt, an dem es dann die Schwebeposition einnimmt. Zur Verdeutlichung siehe Abb. 15.



**Abb. 15** Illustration eines Bioreaktor-Gefäßes mit skizzierten Kräften zur Verdeutlichung der Corioliskraft

## 2.6. Versuchsaufbau

Die besondere Anforderung bei dem Versuchsaufbau bestand darin, im räumlich limitierten Brutschrank zum einen ein elektromagnetisches Feld zu generieren und zum anderen eine Vorrichtung zur Erzeugung simulierter Mikrogravitation innerhalb dieses Magnetfeldsystems zu integrieren. Dazu sollte ursprünglich das von der Firma Synthecon lizenzierte RCCS genutzt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass sich dieses System, wie unter 1.4.2. näher erläutert, nicht für unseren Versuch eignete. Aus diesem Grund haben wir das Konzept überarbeitet und für unseren Versuch optimiert. Das System ist dabei mit dem der Firma Synthecon vergleichbar und mit

dessen Bioreaktor-Gefäßen kompatibel, sodass diese auch Verwendung in den Versuchen fanden.

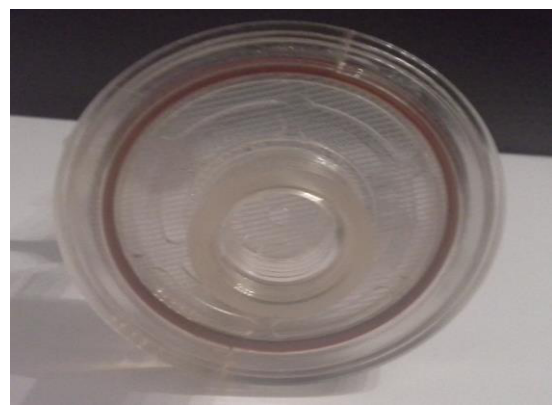
Wie bereits zuvor erwähnt besteht das gesamte System aus einem Motor, der die erforderliche Rotationsbewegung generiert, einem Magnetfeldgenerator, der zwischen 2 parallel angeordneten Magnetfeldspulen ein Magnetfeld erzeugt und die Bioreaktoreinheit, an der die Vessels über eine Schraubvorrichtung befestigt werden.

Die Magnetspulen erzeugen im aktiven Zustand vermehrt Wärme und geben diese an die Umgebung ab. Um eine Beeinträchtigung der Wachstumsbedingungen für die Zellen zu verhindern, wurde daher ein Kühlsystem bestehend aus einem Plexiglas-Gehäuse und einem Umwälz-Kühlsystem der Firma Haake installiert, in dem die Spulen in einem Kreislauf mit Wasser umspült und gekühlt wurden, sodass die Temperatur im Brutschrank im Bereich der Proben in einem konstanten Temperaturfenster von  $37 \pm 0,25 \text{ °C}$  gehalten werden konnte. Eine Steuerungselektronik ermöglichte die Steuerung der Umdrehungsgeschwindigkeit. Die Erfassung der Temperatur und die Einstellung des Magnetfeldes erfolgten computergesteuert. Die Bioreaktor-Gefäße der Firma Synthecon bestehen aus Kunststoff und weisen auf der Rückseite eine semipermeable Membran auf, die einen Gasaustausch mit der Umgebung ermöglicht. Zur Befüllung des RCCS mit Medium befinden sich 3 verschließbare Öffnungen auf der Vorderseite des Gefäßes.

a)



b)



**Abb. 16** Bioreaktor-Vessel der Firma Synthecon mit 3 Öffnungen zur Befüllung und semipermeabler Membran auf der Rückseite zum Gasaustausch: a) Vorderseite, b) Rückseite



### 2.6.1. Versuchsaufbau mit angepasstem RCCS

Auf Grund des nachgewiesenen Magnetfeldes, das durch den Elektromotor im Gehäuse der Vesselbefestigung erzeugt wurde, haben wir nach einer Lösung für dieses Problem gesucht.

Diese lag darin, den Motor auszulagern und die Rotationsbewegung durch den Einsatz einer biegsamen Welle auf das zylindrische Hohlsystems zu übertragen. Diese Änderungen waren jedoch nur durch eine Neukonstruktion des Systems möglich, die durch die „Neue Magnetodyn GmbH“ durchgeführt wurde. Dank der Auslagerung ist das durch den Motor erzeugte Magnetfeld nicht mehr im Wirkungsbereich des von uns gezielt erzeugten Magnetfeldes und somit eine ungewollte Interaktion ausgeschlossen. Zur Kultivierung der Pellets im Bioreaktor wurden weiterhin die original Vessels von Synthecon verwendet. Einen Überblick über den Versuchsaufbau gibt Abb. 17.

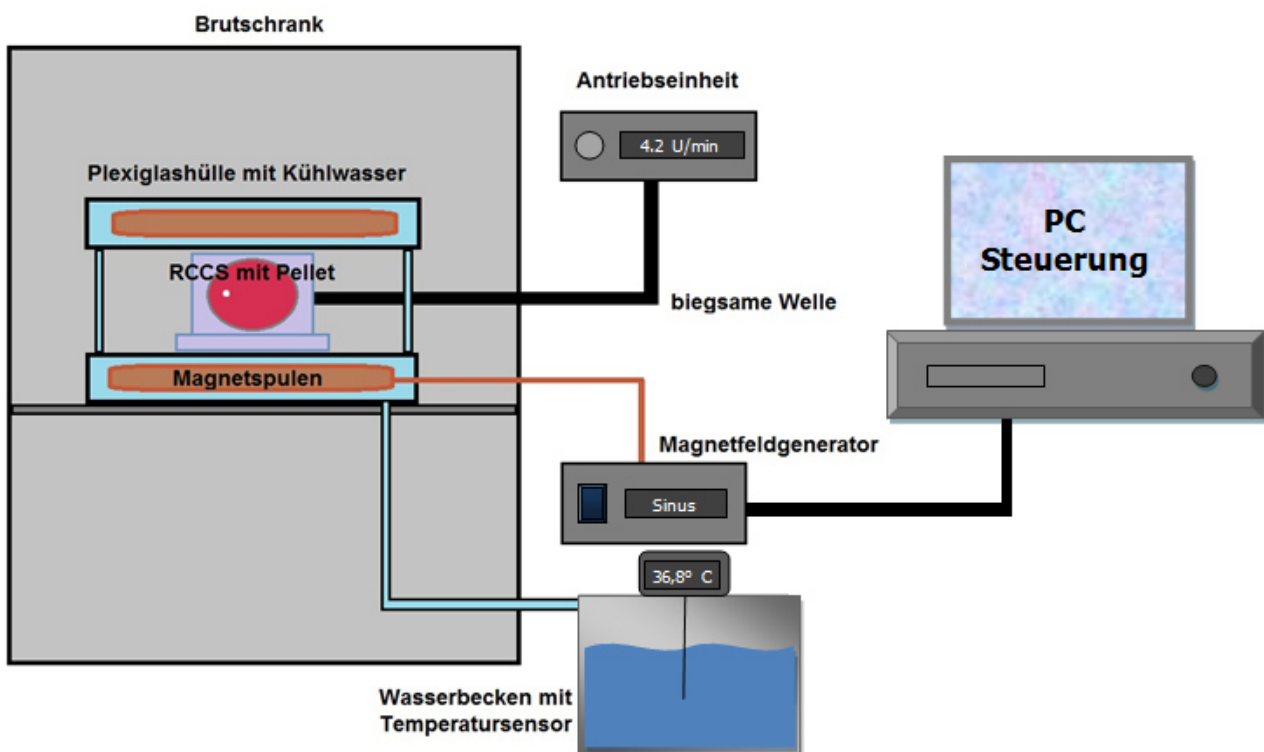


Abb. 17 Schematische Darstellung der einzelnen Komponenten des Versuchsaufbaus und deren Interaktion

Prinzipiell war es für die Durchführung der Versuche bedeutsam ein System zu haben, das es erlaubt um den Bioreaktor eine Magnetfeld Anordnung aufzubauen das per se kein Magnetfeld in der Nähe des Vessels erzeugt. Wichtig für die Durchführung war die Erzeugung einer möglichst gleichmäßigen und konstanten Drehgeschwindigkeit, die sich stufenweise regulieren lässt. Dies wurde durch das

Magnetodyn-System ermöglicht. So wurde der Motor mitsamt Steuereinheit nach außen verlagert und die Kraftwirkung über eine biegsame Welle zum Bioreaktor weitergeleitet. Die Steuereinheit ermöglicht es auf 0,1 Umdrehungen pro Sekunde genau die Drehgeschwindigkeit einzustellen. Die Einstellung der Werte erfolgte durch visuelle Kontrolle und Korrektur der Geschwindigkeit, falls das Pellet nicht frei im Vessel schwebte.

## **2.7. Histologische und immunhistologische Färbungen**

Eine Möglichkeit um gewisse Proteine oder Strukturelemente nachzuweisen sind Färbungen. Dabei ist zwar keine genaue quantitative Aussage möglich, aber im Querschnitt lässt sich erkennen ob gewisse Proteine überhaupt vorliegen und wenn ja, wie die Verteilung von außen nach innen ist.

### **2.7.1. Anfertigung der Schnittpräparate**

Zunächst wurden die Pellets aus den Eppendorfgläsern oder dem Bioreaktor vorsichtig in ein Cryomoldschälchen transferiert. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und zur Reinigung von Mediumresten 500 µl PBS hinzugegeben und wieder abpipettiert. Daraufhin folgte eine Zugabe von 200 µl Succrose-Lösung (5%) für 10 Minuten, die dafür sorgt, dass das Pellet außen verklebt. Nach der Behandlung mit der Succrose-Lösung wurde das Gefäß mit Tissue-Tek gefüllt und bei -80° weggefroren.

Dieser Ablauf erlaubt es die Pellets über einen gewissen Zeitraum zu konservieren, um sie dann bei Bedarf aus der Kühlung zu nehmen und für die histologische Auswertung weiterzuverarbeiten. Dabei wurden die Gefrierpräparate mit einem Kryotom in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden auf Objektträger transferiert und dann erneut bei -80 °C eingefroren. Diese vorgefertigten Schnittpräparate wurden bei Bedarf aus dem Gefrierschrank entnommen und entsprechend der Protokolle histologisch aufgearbeitet.

### **2.7.2. Safranin-O-Lichtgrün-Färbung**

#### **2.7.2.1. Grundlagen**

Bei der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung handelt es sich um eine Färbung, die dazu geeignet ist Proteoglykane, wie sie typischerweise im Rahmen der chondrogenen Differenzierung auftreten, darzustellen. Bereiche mit einem hohen Proteoglykangehalt werden dabei rot dargestellt und Zonen mit niedrigem

Proteoglykangehalt bläulich-grün. Für diese Färbung wurde zunächst eine 1,5%ige Stammlösung hergestellt (3 g Safranin-O in 200 ml Aqua dest. gelöst). Diese Stammlösung wurde für die Färbung im Verhältnis 1:2 mit Aqua dest. verdünnt, sodass die Färbung mit einer 0,75%igen wässrigen Safranin-O-Lösung sowie Fast-Green in einer 0,02%igen alkoholischen Lösung (0,02 g Fast Green in 100 ml Ethanol 95%) durchgeführt wurde. Vor Verwendung wurden die Farben durch einen Faltenfilter in ein sauberes Becherglas gefüllt.

### **2.8.2.2. Durchführung**

Der erste Schritt der Färbung besteht in einer 5 minütigen Wässerung der Schnittpräparate in Aqua dest.. Anschließend folgte die Färbung mit Safranin-O über 2 Minuten. Danach wurden die Schnittpräparate dreimal mit Aqua dest. gewaschen, bevor die Gegenfärbung für 10 Sekunden mit Fast-Green erfolgte.

Daraufhin wurden sie für 60 Sekunden in Eisessig (1%) getaucht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96% → 99% → 99%) und Rotihistol entwässert. Die Eindeckung des Präparates erfolgte mit Eukitt.

### **2.8.3. Alzianblau-Färbung**

#### **2.8.3.1. Grundlagen**

Bei der Alzianblau-Färbung handelt es sich ebenfalls um eine proteoglykanspezifische Färbemethode, die auch das knorpeltypische Proteoglykan Chondroitinsulfat blau anfärbt und nachweisen kann.

Allerdings werden auch andere Proteoglykane angefärbt und somit stellt es keinen sicheren Knorpelnachweis dar.

Die Anfärbung basiert auf dem Prinzip, dass diese Proteoglykane eine negative Ladung tragen, an welche der Farbstoff bindet. Um eine Reaktion mit anderen negativ geladenen Teilchen zu verhindern, beispielsweise aus dem Zellkern, muss das Präparat wie unter 2.8.3.2 erläutert entsprechend vorbereitet werden.

Gefärbt wurde mit einer 1%igen Alzianblaulösung (5 g Alcian blue 8GX Pulver in ein Gemisch aus 15 ml 100%iger Essigsäure in 500 ml Aqua dest. bei pH 2,5). Die Gegenfärbung erfolgte mit einer bereits im gebrauchsfertigen Zustand gelieferten, in 5% Aluminiumsulfat gelösten Kernechtrot-Lösung (0,1%). Beide Lösungen wurden vor Gebrauch über einen Faltenfilter filtriert.

### **2.8.3.2. Durchführung**

Zu Beginn wurden die Schnittpräparate für 1 Minute in Aqua dest. gewässert. Danach folgte ein Bad in Essigsäure (3%) für 3 Minuten und anschließend die Färbung mit der Alzianblau-Lösung (1%) für 60 Minuten. Nach diesem Schritt wurden die Präparate erneut zunächst für 30 Sekunden in 3%iger Essigsäure und dann mit Aqua dest. für 1 Minute gewaschen. Nach dem erneuten Waschen erfolgte die Gegenfärbung mit der Kernechtrot-Lösung (0,1%) über 5 Minuten. Anschließend wurde nochmal mit Aqua dest. für 1 Minute gewaschen und zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (40% → 70% → 100% für je 2 Minuten) und Rotihistol verwendet. Die Schnittpräparate wurden mit dem Kunstharz DPX eingedeckt.

## **2.8.4. Toluidinblau-Färbung**

### **2.8.4.1. Grundlagen**

Zur Darstellung der Glykosaminoglykane verwendeten wir Toluidinblau. Das Prinzip der Anfärbung basiert wie bei der Alzianblaufärbung auf der Interaktion mit negativ geladenen Teilchen. Es wurde in einer 1%igen Färbelösung verwendet (1 g Toluidinblau + 1 g Natriumtetraborat in 100 ml Aqua dest. gelöst und 2mal filtriert). Im Rahmen dieser Färbung werden Glykosaminoglykane rot-violett angefärbt. Vor Gebrauch des Farbstoffes wurde dieser durch einen Faltenfilter gefiltert.

### **2.8.4.2. Durchführung**

Der erste Schritt bestand aus der Färbung mit Toluidinblau (1%) für 3 Minuten. Danach wurden die Präparate über 2 Stunden mit Leitungswasser gewaschen bis keine Farbschlieren mehr zu sehen waren. Dabei wurde das ausgewaschene Wasser alle 20 Minuten durch frisches Leitungswasser ersetzt. Nach dem Abwaschen des überschüssigen Farbstoffes erfolgten das Trocknen der Schnittpräparate mit Filterpapier und das Eindecken in DPX.

## **2.8.5. Immunhistologische Anfärbung von Kollagen II**

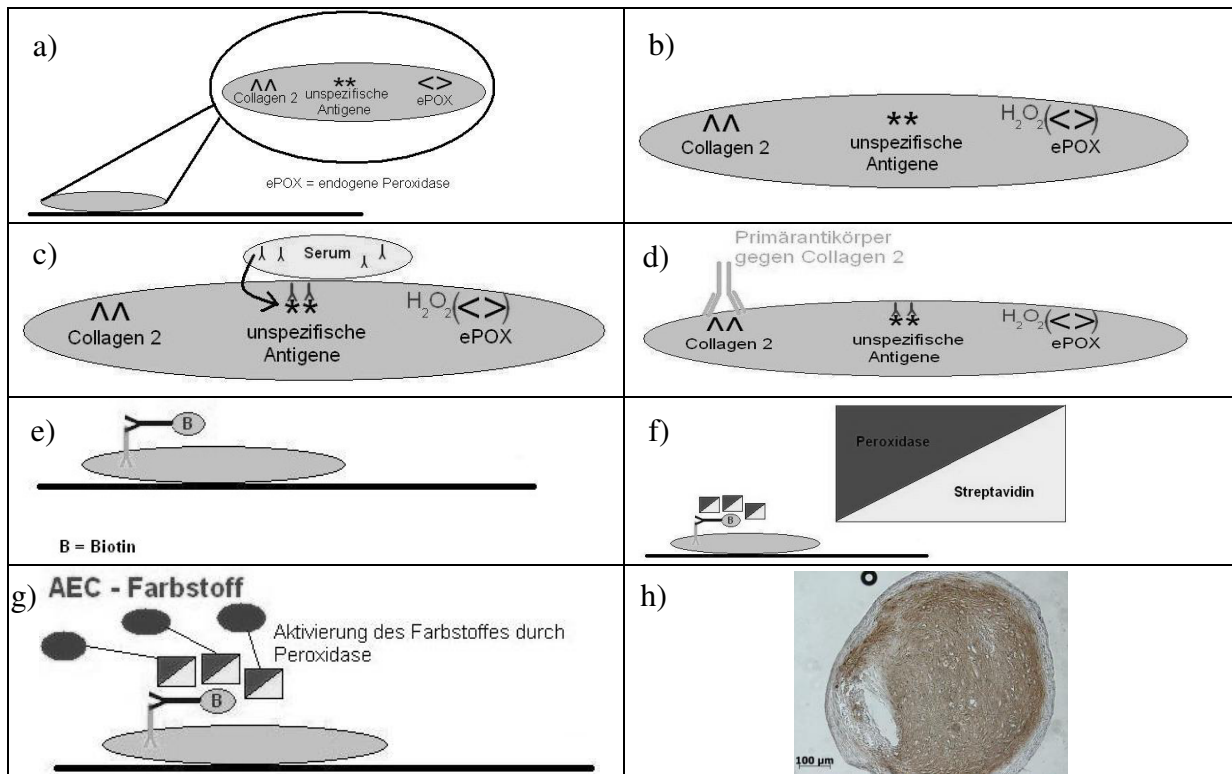
### **2.8.5.1. Grundlagen**

Bei der immunhistologischen Färbung von Kollagen II verwendeten wir zum einen spezifische Mausantikörper gegen Kollagen II und zum anderen biotinylierte

Ziegenantikörper gegen Masantigene. Somit wird vorhandenes Kollagen II über die beiden Antikörper mit Biotin markiert. Die Markierung mit Biotin sorgt dafür, dass ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex binden kann, der in der Lage ist im letzten Schritt den Farbstoff zu aktivieren und somit zur spezifischen Anfärbung führt.

### 2.8.5.2. Durchführung

Nach dem Auftauen der Gefrierschnitte erfolgte eine 15 minütige Rehydratation in PBS. Zunächst wurde die endogene Peroxidase durch eine Zugabe von Wasserstoff-Peroxid für 30 Minuten inaktiviert, da die endogene Peroxidase zu einer Aktivierung des Farbstoffes und somit zu einer unspezifischen Anfärbung führt. Anschließend wurden die Präparate zum Entfernen überschüssigen Wasserstoffperoxids für 5 Minuten mit PBS und 0,1%iger Tween20-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Schnittpräparate mit Chondroitinase bedeckt und für 15 Minuten bei 37° im Trockenschrank inkubiert. Dieser Schritt diente dazu die Kollagen II Moleküle für die in den nächsten Schritten folgenden Antikörper zugänglich zu machen. Da sich neben dem zu untersuchenden Kollagen II noch andere potentielle unspezifische Antigene im Schnittpräparat befinden, an die unser Antikörper binden könnte, wurden diese 60 Minuten lang mit Ziegen-Serum (1:20 mit PBS verdünnt) blockiert. Danach wurde der spezifische Kollagen II-Antikörper von der Maus hinzugegeben. Die Inkubation mit diesem Antikörper erfolgt über Nacht bei +4°C im Kühlschrank. Bei der Negativkontrolle wurde an Stelle des Antikörper PBS verwendet. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst das Waschen der Präparate mit PBS und 0,01%igem Tween20 um ungebundene Antikörper-Reste zu entfernen und somit eine unspezifische Färbung zu vermeiden. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper von der Ziege, der durch einen Biotin-Rest markiert ist, hinzugegeben. Der sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper von der Maus gerichtet und kann somit an diesen binden. Die Aufgabe des Biotin Restes ist es, dass der sogenannte ABC-Komplex (Vectastatin ABC Kit), bestehend aus einer Peroxidase und Streptavidin, das eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin besitzt, binden kann. Durch die Bindung kommt es zu einer Aktivierung der Peroxidase im Komplex und der hinzugegeben AEC Farbstoff wird dadurch aktiviert. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, ehe die Präparate mit Aquatex eingedeckt, fixiert und für 24h im Dunkeln gelagert wurden. Eine schematische Übersicht über die immunhistologische Färbung ist in Abb. 18. dargestellt.



**Abb. 18** Ablauf der immunhistologischen Kollagen II Anfärbung

- Schematische Übersicht eines Pellet-Gefrierschnitts mit wichtigen Bestandteilen
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit  $H_2O_2$
- Blockierung unspezifischer Antigene durch Antikörper aus Serum
- Spezifische Markierung von Kollagen 2 durch Antikörper
- Bindung von einem weiteren Antikörper (biotinyliert) an den ersten Antikörper
- Bindung des ABC-Komplexes (Peroxidase + Streptavidin) an Biotin
- Hinzugeben von AEC-Farbstoff, Aktivierung des Farbstoffes durch die Peroxidase des ABC-Komplexes
- Gefärbtes Präparat im Mikroskop

## 2.8. Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1. Aufbereitung der Pellets mit dem Dismembrator

Für die molekularbiologische Auswertung war es zunächst notwendig RNA aus den Zellen zu gewinnen. Der erste Schritt hierzu war die Aufbereitung der Zellpellets im Dismembrator, der die Pellets zermahlte und somit zu einer Freisetzung der RNA führte. Hierfür wurden die Pellets nach Abschluss der 21 Versuchstage in spezielle Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden ebenfalls in Stickstoff gekühlte Metallkugeln, die zuvor in Ethanol gereinigt wurden, in die Kryoröhrchen gegeben und das Ganze dann im Dismembrator verankert. Der Dismembrator schüttelte die Vials eine Minute lang mit 3000 RPM/min. Hierbei kam es durch die Auf- und Abbewegung der Kugeln innerhalb der Vials zum Zermahlen der Zellen und zu einer Freisetzung der RNA. Nach Entfernung der Metallkugel wurden die restlichen Zellbestandteile und die freigesetzte RNA mit 750  $\mu$ l QIAzol lysiert.

### 2.8.2. Isolierung der RNA

Das oben beschriebene QIAzol-Gemisch enthält nicht nur RNA, sondern auch noch andere Zellbestandteile, sodass man zur weiteren Auswertung die RNA von den anderen Bestandteilen isolieren musste. Hierfür wurden zunächst 750 µl des QIAzol-Gemisches mit 200 µl Chloroform bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Trennung der einzelnen Bestandteile durch Zentrifugation bei 15000x g über 20 Minuten bei 4°C. Nach dem Zentrifugieren wurden 3 Phasen sichtbar: Unten eine rote, hauptsächlich aus festen Zellbestandteilen bestehende Phase, dazwischen eine weiße Interphase und darüber eine klare, wässrige Phase in der sich auch die RNA befand. Diese RNA-haltige Phase wurde abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben, ohne dabei jedoch andere Phasen mitzunehmen. Bei diesem Vorgang wurde genau auf die abpipettierte Menge geachtet, da 70%iger Ethanol im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und vermischt werden musste. Zur weiteren Verarbeitung wurden jeweils maximal 700 µl in eine Zentrifugationssäule gegeben und das Ganze in ein Eppendorfgefäß gesteckt und bei 10 000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert.

Der Durchfluss, der durch die Zentrifugation entstanden war, wurde verworfen und der obere Zentrifugationsschritt bei Mengen über 700µl solange wiederholt bis kein Lysat mehr übrig war. Der weitere Ablauf erfolgte unter Zuhilfenahme des RNEasy-Mini-Kit von Qiagen. Hierbei mussten zunächst 350 µl RW1-Buffer auf die Zentrifugationssäule pipettiert und das Ganze erneut für 20 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss abermals verworfen und der Schritt mit dem RW1-Buffer erneut wiederholt werden.

Danach wurden 500 µl RPE-Buffer hinzugegeben und es erfolgte erneut eine Zentrifugation für 20 Sekunden bei 10000 rpm. Der Durchfluss wurde nochmals verworfen und der Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Nach den repetitiven Zentrifugationsschritten wurde die Säule in ein neues Collection-Tube gestellt und 30 µl Wasser auf die Säule pipettiert. Es folgte die Zentrifugation über eine Minute, sodass sich das Wasser zusammen mit der RNA nun im Reaktionsgefäß befand. Anschließend wurde die RNA umgehend auf Eis gekühlt.

Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

### 2.8.3. Synthese von cDNA

Zur Synthese der cDNA wurden 0,3 µg RNA eingesetzt und mit dem QuantiTect Rev. Transcription Kit weiterverarbeitet. Dazu war es zunächst erforderlich das benötigte Volumen der RNA von  $x \mu\text{l}$  bei bekannter Wunschmasse (0,3 µg) anhand der photometrischen Werte im Dreisatz zu berechnen. Ziel war es ein RNA-Primer-Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 11,4 µl zu erreichen. Darin enthalten ist die erforderliche Menge von 2 µl Random-Primer, sodass die restlichen 9,4 µl durch ein Gemisch aus RNA und Wasser bestehen. Für die erforderliche Wassermenge wird einfach das oben ermittelte RNA-Volumen abgezogen ( $9,4 \mu\text{l} - x \mu\text{l}$ ).

<b>Probe(RNA)</b>	$x \mu\text{l}$
<b>Random-Primer</b>	2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	$9,4\mu\text{l} - x \mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen:</b>	11,4 µl

**Tab. 3** Protokoll zur cDNA-Synthese. Ermittelt werden muss der Wert  $x$  für das einzusetzende RNA-Volumen. Dies geschieht im Dreisatz aus der Zielmasse von 0,3 µg RNA und den photometrischen Werten.

Das Ganze wurde in einem PCR-Tube gemischt und im Thermocycler inkubiert. Während der Inkubation wurde der sogenannte Master-Mix (siehe Tab. 4.) vorbereitet, der anschließend zu je 8,6 µl pro PCR-Tube hinzugegeben und abermals im Thermocycler inkubiert wurde. Die benötigte cDNA wurde direkt im Anschluss in einer qt-RT-PCR analysiert und der Rest bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mögliche spätere Untersuchungen weggefroren.

<b>Komponente</b>	<b>Benötigte Menge pro Probe</b>
RT- Puffer 5x	4 µl
Protector RNase Inhibitor	0,5 µl
Desoxynucleotid Mix	2 µl
DTT	1 µl
RTranskriptase	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8.6 µl</b>

**Tab. 4** Bestandteile des Master-Mix

### 2.7.4. Quantitative RT-PCR

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Real-Time-PCR. Als House-Keeping Gen entschieden wir uns für GAPDH, da in vorherigen Versuchen im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie bereits gezeigt werden konnte, dass die



Expression nicht reguliert wird und weitestgehend unabhängig von anderen Faktoren stattfindet. Das House-Keeping Gen erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit einzelner Ergebnisse verschiedener Pellets untereinander, insbesondere dann, wenn verschiedene Mengen cDNA eingesetzt wurden.

Zum Nachweis der Knorpelbildung wurden die Marker Kollagen II und Aggrecan verwendet. SOX-9 wurde als Marker gewählt um Hinweise auf die Induktion der enchondralen Ossifikation zu gewinnen. Zum Nachweis der terminalen Hypertrophie mit Kalzifikation der Knorpelmatrix kam Kollagen X als spezifischer Marker zum Einsatz.

Die PCR wurde mit Hilfe des Lightcyclers 2.0 Karussell-System der Firma Roche durchgeführt, mit dessen Hilfe es möglich ist anzuzeigen wie viele PCR-Zyklen notwendig sind, um das zu untersuchende Protein in einer bestimmten Menge zu vervielfältigen. Diesen Punkt, an dem diese Menge erreicht ist, bezeichnet man als Crossing Point. Das Prinzip des Light-Cyclers beruht auf einer Absorptionsmessung des Materials, das durch SybrGreen, ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, markiert wird. Dieser Farbstoff lagert sich in die doppelsträngige DNA ein und zeichnet sich durch eine Absorption von blauem Licht (Wellenlänge = 494 nm), sowie eine Emission von grünem Licht (Wellenlänge = 521 nm) aus [Zipper et al., 2004]. Da SybrGreen auch unspezifisch an Primerdimere oder andere DNA Nebenprodukte binden kann, wurde zusätzlich im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Der Ablauf der Light-Cycler Analyse sah zunächst eine Verdünnung von 1 µl cDNA mit 9 µl Wasser vor. Anschließend wurde eine 10 µl Mischung aus Primern und SybrGreen hinzugegeben und das Ganze in die speziellen PCR-Kapillaren pipettiert. Zur weiteren Analyse wurden diese Kapillaren in den Lightcycler gegeben und in Abhängigkeit des verwendeten Primers ein spezielles Programm am Computer gewählt, mit dem die Analyse gestartet wurde. Als Negativkontrolle wurde statt der cDNA 1 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Während des gesamten Ablaufs wurde stets auf eine gute Kühlung des Materials geachtet.

Prozess	Temperatur	Temperaturanstieg	Dauer	Zyklen
<b>Denaturierung</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	600 Sek.	1
<b>Amplifikation</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	45
	65 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	72 ° C	20 ° C / Sek.	15 Sek.	
<b>Schmelzkurvenanalyse</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	0 Sek.	1
	58 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	95 ° C	0,1 ° C / Sek.	0 Sek.	
<b>Kühlung</b>	40 ° C	20 ° C / Sek.	30 Sek.	1

Tab. 5 PCR-Programm für Kollagen II und Aggrekan

Prozess	Temperatur	Temperaturanstieg	Dauer	Zyklen
<b>Denaturierung</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	600 Sek.	1
<b>Amplifikation</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	35
	68 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	72 ° C	20 ° C / Sek.	15 Sek.	
<b>Schmelzkurvenanalyse</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	0 Sek.	1
	58 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	95 ° C	0,1 ° C / Sek.	0 Sek.	
<b>Kühlung</b>	40 ° C	20 ° C / Sek.	30 Sek.	1

Tab. 6 PCR-Programm für Kollagen X

Prozess	Temperatur	Temperaturanstieg	Dauer	Zyklen
<b>Denaturierung</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	600 Sek.	1
<b>Amplifikation</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	40
	65 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	72 ° C	20 ° C / Sek.	15 Sek.	
<b>Schmelzkurvenanalyse</b>	95 ° C	20 ° C / Sek.	0 Sek.	1
	58 ° C	20 ° C / Sek.	10 Sek.	
	95 ° C	0,1 ° C / Sek.	0 Sek.	
<b>Kühlung</b>	40 ° C	20 ° C / Sek.	30 Sek.	1

Tab. 7 PCR-Programm für GAPDH und SOX-9

## **2.8.5. Microarray**

### **2.8.5.1. Durchführung**

Die Durchführung des Microarrays erfolgte durch Verwendung des NuGen – Applause WT-Amp ST Systems im Genzentrum der LMU München. Bei Durchführung der Microarray-Analyse wurden die Reagenzien bei -20° C gelagert. Die Einzelschritte sind im Folgenden detailliert beschrieben.

### **2.8.5.2. Bestimmung der RNA Integrität im Bioanalyzer**

Die Durchführung eines Microarrays stellt hohe Ansprüche an die Reinheit der RNA dar, die höher liegt, als es für die Durchführung einer qt-PCR erforderlich ist. Nachdem die cDNA in RNA umgeschrieben wurde, mussten die Proben der einzelnen Versuchsgruppen im Bioanalyzer auf deren Reinheit untersucht werden. Die geeigneten Proben wurden durch das Genzentrum (Klinikum der LMU München) weiterverarbeitet. Die Proben, die in der Bioanalyzer-Untersuchung eine ausreichende RNA-Integrität aufwiesen, wurden für die Microarray-Untersuchung verwendet.

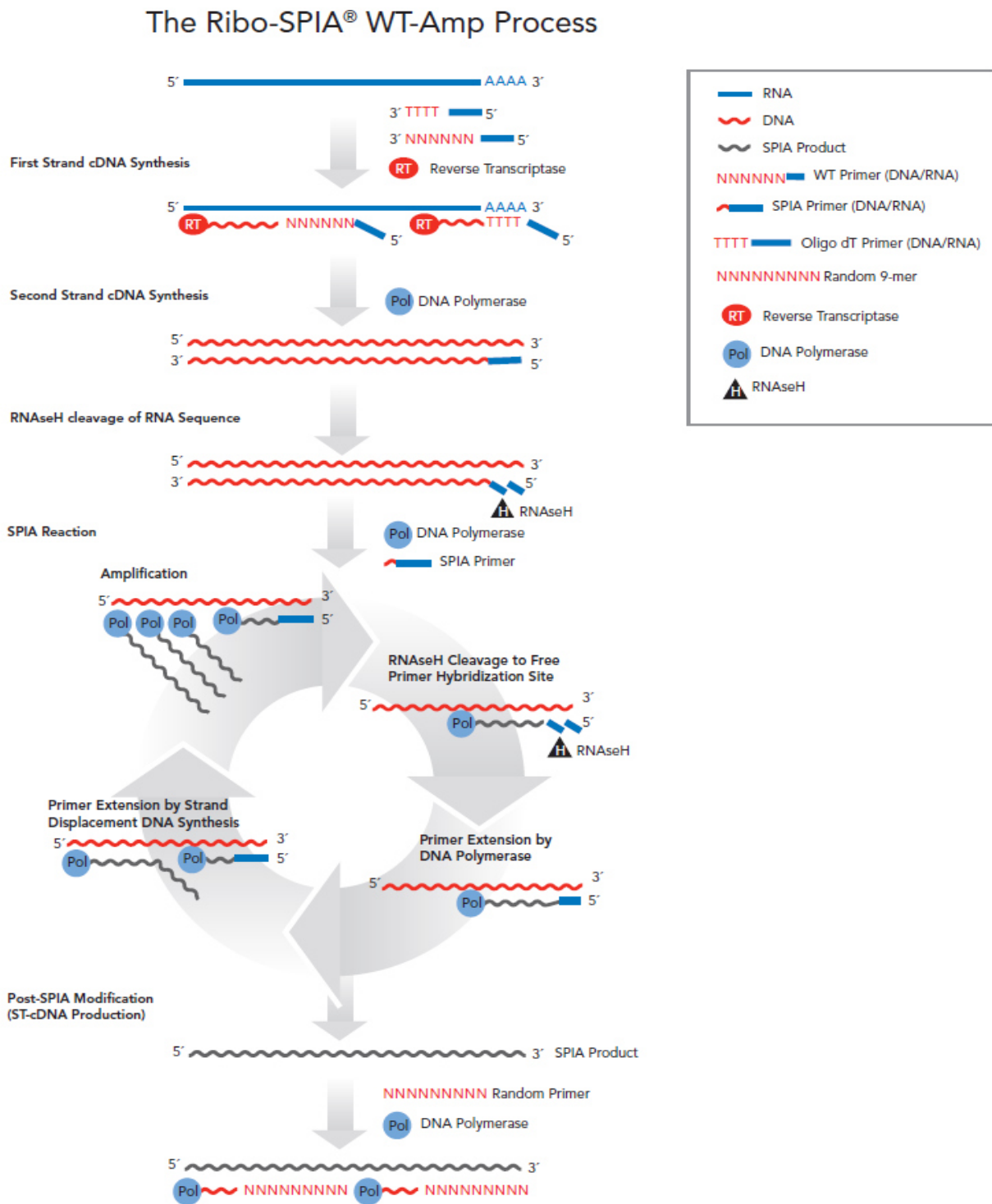
### **2.8.5.3. Erst-Strang cDNA-Synthese**

Der erste Schritt bestand darin, aus der vorhandenen RNA wieder den entsprechenden cDNA-Strang zu bilden. Hierfür wurde unter Verwendung des oben erwähnten NuGen – Applause Systems zunächst ein komplementärer DNA-First Strand gebildet. Zunächst wurden 5 µl der RNA Probe in ein 0,2ml PCR Tube gefüllt und der A1 Strand Primer hinzugefügt. Nach dem Mischen und Zentrifugieren wurde das Gemisch im Thermocycler inkubiert. Danach wurde den Proben der Single-Strand Mastermix hinzugefügt und es erfolgte eine erneute Inkubation im Thermocycler.

Nach der Synthese des Erststranges folgte die Synthese des Zweitstranges. Hierzu wurde der Second-Strand Mastermix verwendet, der zu je 10 µl in die Tubes der vorherigen Reaktion gegeben und anschließend zentrifugiert und inkubiert wurde. Danach wurde mit dem Enhancement-Mastermix das sog. Post-Second Strand Enhancement durchgeführt.

Nach Bildung der beiden DNA-Stränge erfolgte die SPIA Amplifikation durch Zugabe von 8 µl des SPIA Mastermixes und einer erneuten Phase im Thermocycler. Danach folgten die Post-SPIA Modifikationen I und II bevor die Proben in Trockeneis

eingefroren und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Abb. 19. zeigt den Ablauf dieses Schrittes in der Übersicht.



**Abb. 19** Ablauf der cDNA-Erstellung mittels NuGen –Applause System

#### 2.8.5.4. Fragmentation und Labeling der cDNA

Vor der Weiterverarbeitung wurden die cDNA-Proben mit Hilfe von Agencourt AMPure XP Beads, das sind beschichtete, magnetische Metallkügelchen, gereinigt. 20 µl der gereinigten cDNA wurden zunächst durch Zugabe von 5,6 µl des Fragmentations-Mastermixes zerteilt und im Anschluss mit Biotin gelabeled. Am Ende dieses Schrittes wurde im Bioanalyzer kontrolliert, ob die Fragmentation erfolgreich durchgeführt wurde.

#### 2.8.5.5. Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde zunächst der sogenannte Hybridisierungscocktail (siehe Tab. 8.) hergestellt und 112,5 µl davon zu den Proben hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde dann in den Array pipetiert und für 17 Stunden bei 45° C und 60 rpm im Hybridisierungsofen inkubiert.

Komponente	Menge pro Array
Fragmentierte und markierte DNA	37,5 µl
Kontroll-Oligonukleotid B2	2,5 µl
2x Hybridisierungs Mix	75 µl
DMSO	10,5 µl
Nuklease freies Wasser	17 µl
20x Hybridisierungs-Kontrollen (bioB, bioC, bioD, cre)	7,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>150 µl</b>

Tab. 8 Zusammensetzung des Hybridisierungscocktails der Microarrayanalyse

#### 2.8.5.6. Waschen und Färben der Fragmente

Dieser Schritt erfolgte nach der Inkubation in der Fluidics Station. Dazu wurden die Proben mit Waschpuffern und Färbungscocktails bearbeitet. Über die genauen Farbstoffe macht der Hersteller keine exakten Angaben.

#### 2.8.5.7. Auswertung des Microarrays

Die Auswertung der Microarray erfolgte im Array-Scanner. Die Darstellung der Auswertungsergebnisse erfolgte mit ArrayQualityMetrics 3.12.0.

---

## 2.9. Statistische Auswertung

Grundlage für die statistische Auswertung waren die in Excel gebildeten Mittelwerte der einzelnen Versuche, die auf 2 Nachkommastellen gerundet wurden. Bei dem Housekeeping Gen wurden hierzu pro Versuch und Gruppe 2 Werte gemittelt, bei den anderen Genen zum Differenzierungsnachweis je 3 Werte. Aus dem Mittelwert des zu untersuchenden Gens und dem Housekeeping Gens wurde dann ein Quotient gebildet. Die Standardabweichungen wurden ebenfalls in Excel ermittelt.

Die Berechnung des Signifikanzniveaus durch den Mann-Whitney Test erfolgte über das statistische Berechnungsprogramm Prism. Als statistisch signifikant wurde  $p < 0,05$  betrachtet.

---

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Vorversuche

#### 3.1.1. Versuche mit Chondrozyten

Da die Verwendung eines Bioreaktors in dieser Form und in diesem Setting noch nicht erprobt war, musste dieses Verfahren im Rahmen meiner Doktorarbeit etabliert werden. Wichtig war es im Rahmen der Vorversuche einige bedeutsame Fragen für die späteren Hauptversuche experimentell zu beantworten:

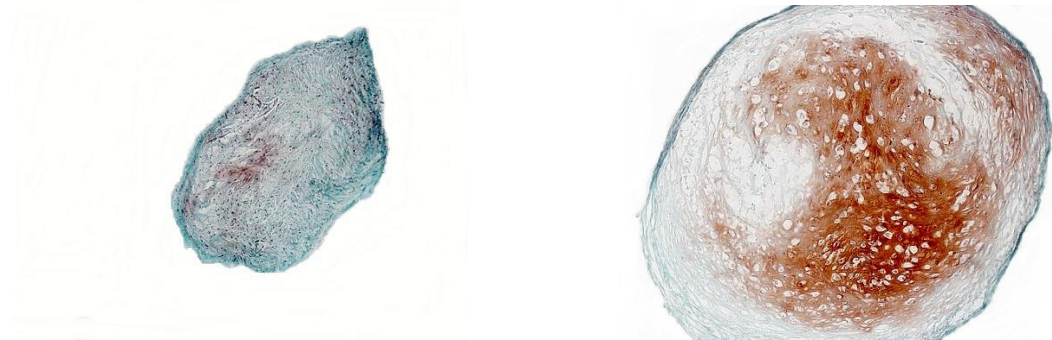
- a) Ist es möglich mehrere Pellets gleichzeitig im Bioreaktor zu kultivieren und wenn ja, wie viele Pellets sind möglich?
- b) Bei welcher Umdrehungsgeschwindigkeit befinden sich die Pellets in einem Schwebezustand?
- c) Wie muss die Kühltemperatur der Magnetspulenkühlung eingestellt werden, um eine möglichst konstante Temperatur von etwa 37° C zu gewährleisten?
- d) Wie kann der Mediumwechsel im Bioreaktor am effektivsten durchgeführt werden, sodass unnötige Manipulationen am Pellet ausbleiben und das Einbringen von Luftblasen in das Medium vermieden wird?

Die genannten Punkte wurden anhand der ersten Vorversuche mit Chondrozyten untersucht. Die Schlussfolgerungen aus den Vorversuchen werde ich im Folgenden darlegen.

##### 3.1.1.1. Anzahl und Größe der Pellets im Bioreaktor

Da die maximale Anzahl der sich gleichzeitig im Bioreaktor befindlicher Pellets einer der wichtigsten limitierenden Faktoren ist war es wichtig zu überprüfen, ob es möglich ist mehrere Pellets gleichzeitig in einem Versuch im Bioreaktor laufen zu lassen. Bei den Vorversuchen zeigte sich dies jedoch als nicht praktikabel, da es zu starken Verformungen der Pellets kam, wie in Abb. 20. zu sehen, und somit augenscheinlich auch zu einer Kräfteinwirkung auf die Pellets, die eine zu starke Beeinflussung der

Ergebnisse nach sich ziehen könnte. Daher entschlossen wir uns, die Anzahl auf ein Pellet im Bioreaktor zu beschränken.



**Abb. 20.** Histologischer Vergleich von zwei Chondrozyten-Pellets (je 250 000 Zellen) im Mehrfach- und Einzelversuch in einer Safranin-O-Fastgreen Färbung  
a) Pellet aus dem Bioreaktor (verformt) aus einem Lauf (1 Woche) mit mehreren Pellets gleichzeitig  
b) Pellet aus dem Bioreaktor (nicht verformt) aus einem Lauf (1 Woche) im Einzelversuch

Da wir somit nur 1 Pellet pro Versuch im Bioreaktor laufen lassen konnten, mussten wir die Zellzahl von den geplanten 250 000 Zellen pro Pellet auf 400 000 Zellen erhöhen, um ausreichend Material für die molekularbiologische Auswertung zu haben. Da eine vergrößertes Pellet jedoch auch eine größere Strecke vom Pelletmittelpunkt nach außen zum Medium nach sich zieht und somit eine Minderversorgung des Pelletkerns verursachen könnte, mussten wir diesen Punkt untersuchen. Eine befürchtete Zellnekrose im Pellet-Zentrum zeigte sich in den Vorversuchen mit erhöhter Zellzahl jedoch nicht, sodass wir in den Hauptversuchen weiterhin mit 400 000 Zellen pro Pellet arbeiten konnten.

### 3.1.1.2 Einstellen der Drehgeschwindigkeit

Da der Einsatz des Mikrogravitationsbioreaktors eine im Labor noch nicht etablierte Methode war, war es erforderlich zu ermitteln welche Auswirkungen Änderungen der Umdrehungsgeschwindigkeit auf den Schwebezustand der Pellets haben. Dazu wurden mehrere Chondrozyten-Pellets nacheinander für einige Tage in den Bioreaktor gegeben und regelmäßig kontrolliert welche Umdrehungsgeschwindigkeit am besten geeignet ist, um die Pellets frei im Bioreaktorgefäß schweben zu lassen. Dies war bei etwa 4 Umdrehungen pro Minute der Fall und lieferte Rückschlüsse für die Einstellungen für den Hauptversuch mit den Stammzellen.



### 3.1.1.3 Einstellen der Temperatur

Vor Beginn der Versuche war es erforderlich die Kühlung der Magnetspulen entsprechend einzustellen, sodass es zum einen nicht zu einer zu starken Erwärmung bei Erzeugung des Magnetfeldes kommt, aber zum anderen auch nicht zu einer zu starken Kühlung des Systems in den Phasen, in denen kein Magnetfeld erzeugt wird.

Die Ermittlung der optimalen Temperatur erfolgte in repetitiven Leerläufen ohne Zellen. Dabei stellte sich ein Wert von 36,7° C für die Spulenkühlung und eine Temperaturwert von 37,0° C für den Inkubator als geeignet heraus, da es unter diesen Einstellungen zu konstanten Werten um 37,0° C ( $\pm 0,25^\circ$  C) mit den geringsten Schwankungen kam.

### 3.1.1.4 Durchführung des Mediumwechsels

Eine besondere Herausforderung war es den Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen durchzuführen und dabei darauf zu achten, dass hierbei keine Luftblasen in das System gelangten, da diese den wichtigen laminaren Fluss hätten stören können.

Hierbei erwies es sich am günstigsten zunächst beide seitlichen Ventile zu öffnen und dann das Medium langsam auf einer Seite mit einer 5 ml Pipettenspitze abzusaugen. Die Befüllung erfolgte ebenfalls mit einer 5 ml Pipettenspitze. Wichtig war es das Bioreaktorgefäß schräg zu halten mit einer Öffnung oben und einer unten, wobei die Befüllung durch die untere stattfand, damit die Luft nach oben entweichen konnte. Durch leichtes Klopfen konnten dabei auch feine Luftbläschen gelöst werden. Nach dem Befüllen mit etwa 10 ml Medium wurden die Öffnungen am Bioreaktor wieder verschlossen.

### 3.1.1.5 Ergebnisse aus den Vorversuchen

Nachdem wir die Bedingungen für die Hauptversuche festgelegt hatten, wurde ein letzter Vorversuch mit Chondrozyten durchgeführt, um die experimentell ermittelten Parameter zu verifizieren. Als Marker für die Chondrogenität haben wir hier Aggrekan verwendet und die Werte einer Negativkontrolle mit magnetfeldstimulierten Chondrozyten mit oder ohne Bioreaktor verglichen. Die Kontrollgruppe wurde dabei auf den Wert 1,0 genormt und die anderen Werte entsprechend angepasst.

	GAPDH			
	Messung1	Messung 2	Mittelwert	SD
Pat. 25 Ø Stimulation	21,440	19,100	20,27	1,655
Pat. 25 EMF, Ø Bio	21,230	20,140	20,685	0,771
Pat. 25 EMF, Bio	19,730	19,750	19,74	0,014

Tab. 9 PCR-Ergebnisse der Vorversuche für GAPDH

	Aggrekan				
	Messung1	Messung 2	Mittelwert	SD	1/GAPDH-Qu.
Ø Stimulation	18,820	18,860	18,84	0,028	1,000
EMF, Ø Bio	19,790	19,820	19,805	0,021	1,145
EMF, Bio	18,170	18,130	18,15	0,028	1,071

Tab. 10 PCR-Ergebnisse der Vorversuche für Aggrekan, sowie der Aggrekan/GAPDH-Quotient, bei dem die Kontrollgruppe ohne Stimulation auf den Wert 1 gemittelt wurde

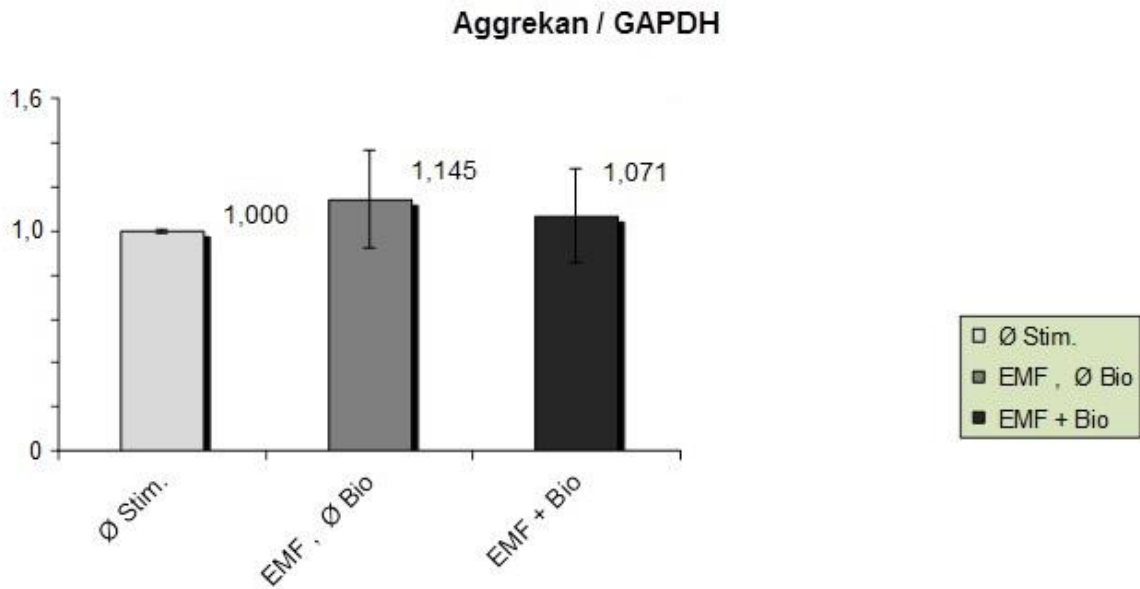


Abb. 21 mRNA Expression von Aggrekan im Verhältnis zu GAPDH in Chondrozyten, die unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder außerhalb eines Bioreaktors (mit EMF, ohne Bioreaktor) oder unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder innerhalb eines Bioreaktors (mit EMF, mit Bioreaktor) kultiviert wurden. Beides wurde jeweils normalisiert auf die unstimulierte Kontrollgruppe (ohne EMF, ohne Bioreaktor).

## 3.2. Hauptversuche

### 3.2.1. Differenzierungspotential der HMSCs

Das Differenzierungspotential wurde nicht gesondert getestet, da die Zellen des verwendeten Spenders bereits bekannt waren und die Differenzierung in die verschiedenen Zellreihen bereits zuvor nachgewiesen wurde [Mayer-Wagner et al., 2010; Mayer-Wagner et al., 2011]. Darüber hinaus garantiert die Firma Lonza, dass die Stammzellen in der Lage sind sich in die verschiedenen Zelllinien zu differenzieren (siehe Abb. 4.) und weist diese auch im Certificate of Analysis nach.

### 3.2.2. Übersicht der Gruppen und Versuche

	TGF	EMF	Bio
<b>Gruppe 1</b>	-	-	-
<b>Gruppe 2</b>	-	+	-
<b>Gruppe 3</b>	+	-	-
<b>Gruppe 4</b>	+	+	-
<b>Gruppe 5</b>	+	+	+
<b>Gruppe 6</b>	+	-	+

} Negativkontrollen

Tab. 11 Übersicht über die gewählten Parameter entsprechend ihrer Gruppe

### 3.2.3. Histologischer Auswertung

#### 3.2.3.1. Übersicht der Färbungen und Pellets

In diesem Abschnitt werden Pellets der verschiedenen Gruppen entsprechend der jeweiligen Färbung in einem Ausschnitt der 10-fachen Vergrößerung (siehe Abb. 3.3.) gegenübergestellt. Was hierbei prima vista auffällt ist die fehlende Anfärbbarkeit der Pellets der Gruppen 1-2, die ohne TGF-Stimulation scheinbar keine chondrogene Matrix bilden. Die Pellets der anderen vier Gruppen, die eine positive Anfärbung zeigten, wurden zusätzlich in einer 20-fachen Vergrößerung näher betrachtet und sind in den folgenden Punkten vergleichend gegenübergestellt.

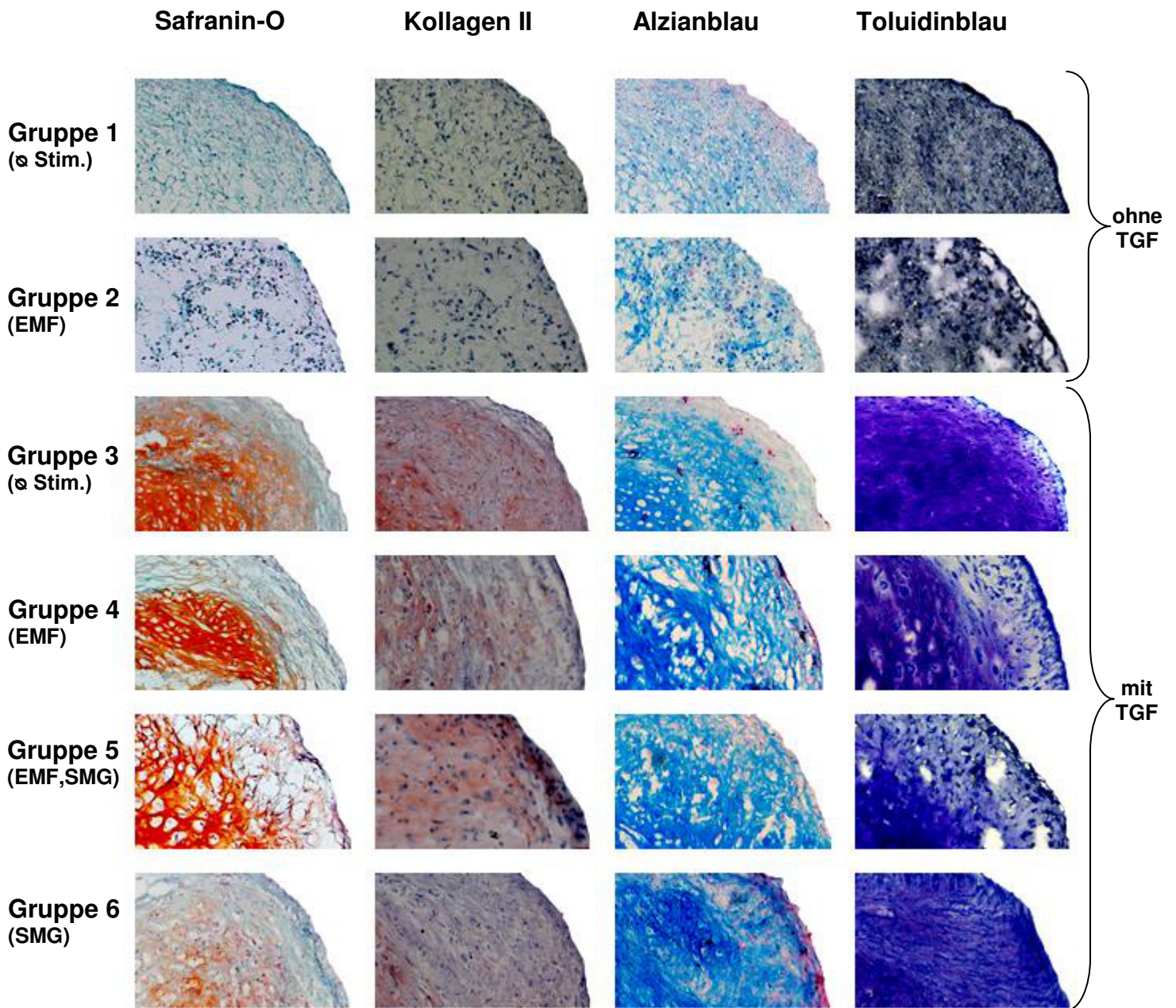
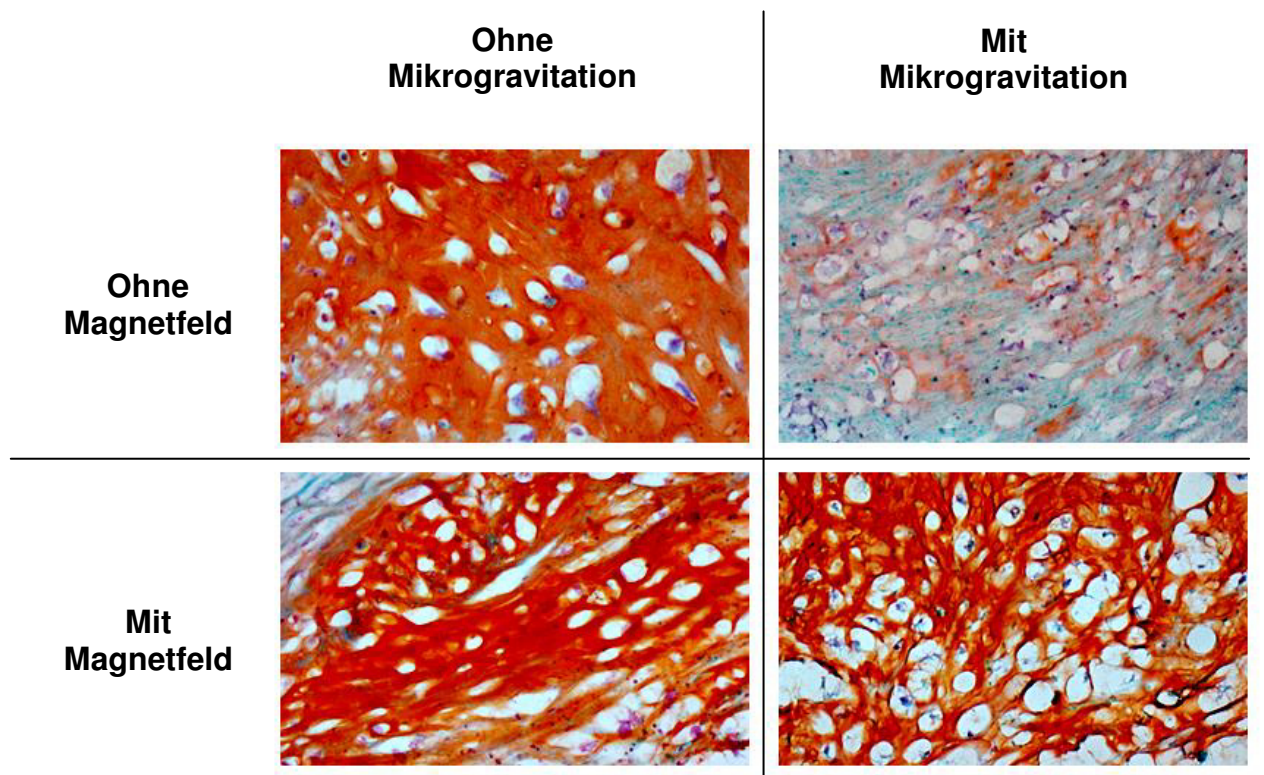


Abb. 22. Ausschnitte der verschiedenen Färbungen aller Versuchsgruppen in 10-facher Vergrößerung (Balken  $\approx 100 \mu\text{m}$ )

### 3.2.3.2. Safranin-O-Fast-Green Färbung

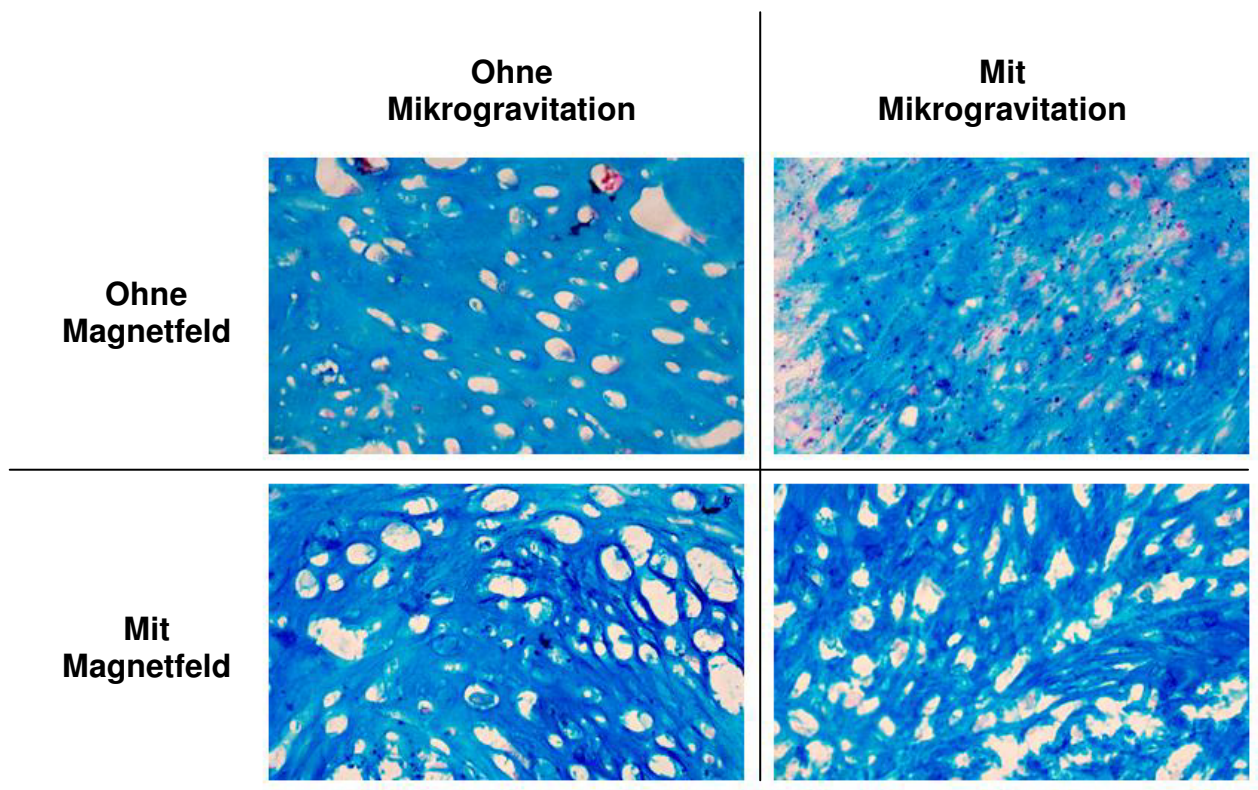
Die Safranin-O-Fast-Green Färbung zeigte in den Negativkontrollen der Gruppen 1 und 2 bei Abwesenheit des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  keinerlei proteoglykanspezifische Anfärbung. Die anderen Gruppen sind entsprechend ihrer Stimulation mit Magnetfeld bzw. Bioreaktor in Abb. 23. dargestellt. Man sieht in der nur mit TGF- $\beta$  stimulierten Gruppe eine kräftige Anfärbung und eine dichte Struktur des Gewebes. Bei zusätzlicher Stimulation im Bioreaktor (Gruppe 6) zeigt sich hingegen nur ein dezenter Proteoglykangehalt. In Gruppe 4, die neben der TGF- $\beta$  Stimulation noch im EMF befördert wurde, zeigt sich auch eine kräftige Anfärbung einer dichten proteoglykanhaltigen Binnenstruktur. Die Gruppe 5, die sowohl im Bioreaktor als auch im EMF stimuliert wurde präsentiert sich ebenfalls durch einen deutlichen Proteoglykangehalt, allerdings fällt in der Safranin-O-Färbung eine vakuolenartige Auflockerung des Gewebes auf.



**Abb. 23.** Histologischer Vergleich der Safranin-O-Fast-Green-Färbung in einem Ausschnitt der 20-fachen Vergrößerung (G3-G6: Gruppe 3 -6, Balken  $\approx$  100  $\mu$ m)

### 3.2.3.3. Alzianblau Färbung

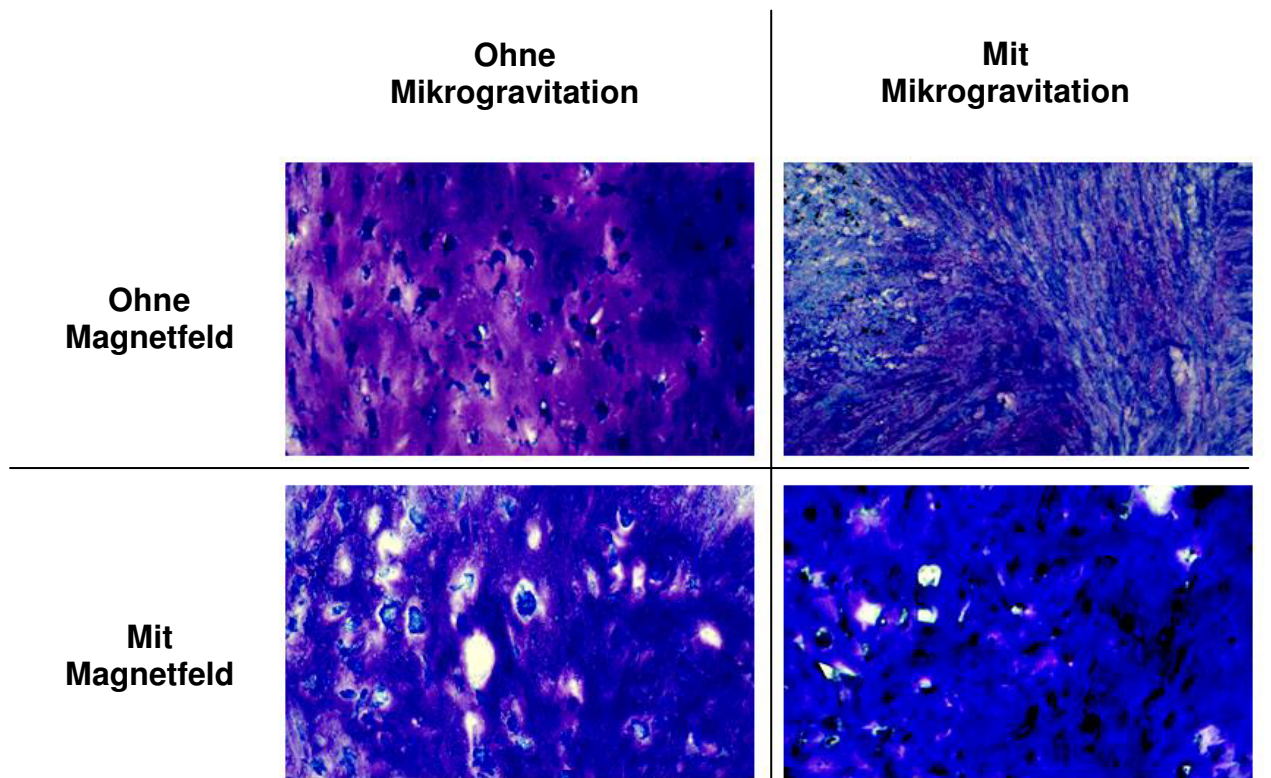
Auch in der Alzianblau Färbung zeigte sich in den Negativkontrollen der Gruppen 1 und 2, wie zu erwarten war, keinerlei proteoglykanspezifische Anfärbung. Die anderen Gruppen sind entsprechend ihrer Stimulation mit Magnetfeld bzw. Bioreaktor in Abb. 24. dargestellt. In dieser Färbung sieht man eine vergleichbare Färbung der Gruppen 3-5, die sich durch eine intensive Blaufärbung und einer ähnlichen Binnenstruktur des Gewebes darstellen. In Gruppe 6 wirkt die Gewebestruktur etwas kompakter, allerdings ist die Blaufärbung nicht so homogen wie in den anderen drei Gruppen und weist auf einen geringeren Proteoglykangehalt hin.



**Abb. 24.** Histologischer Vergleich der Alzianblau-Färbung in einem Ausschnitt der 20-fachen Vergrößerung (G3-G6: Gruppe 3 -6, Balken  $\approx 100 \mu\text{m}$ )

### 3.2.3.4. Toluidinblau Färbung

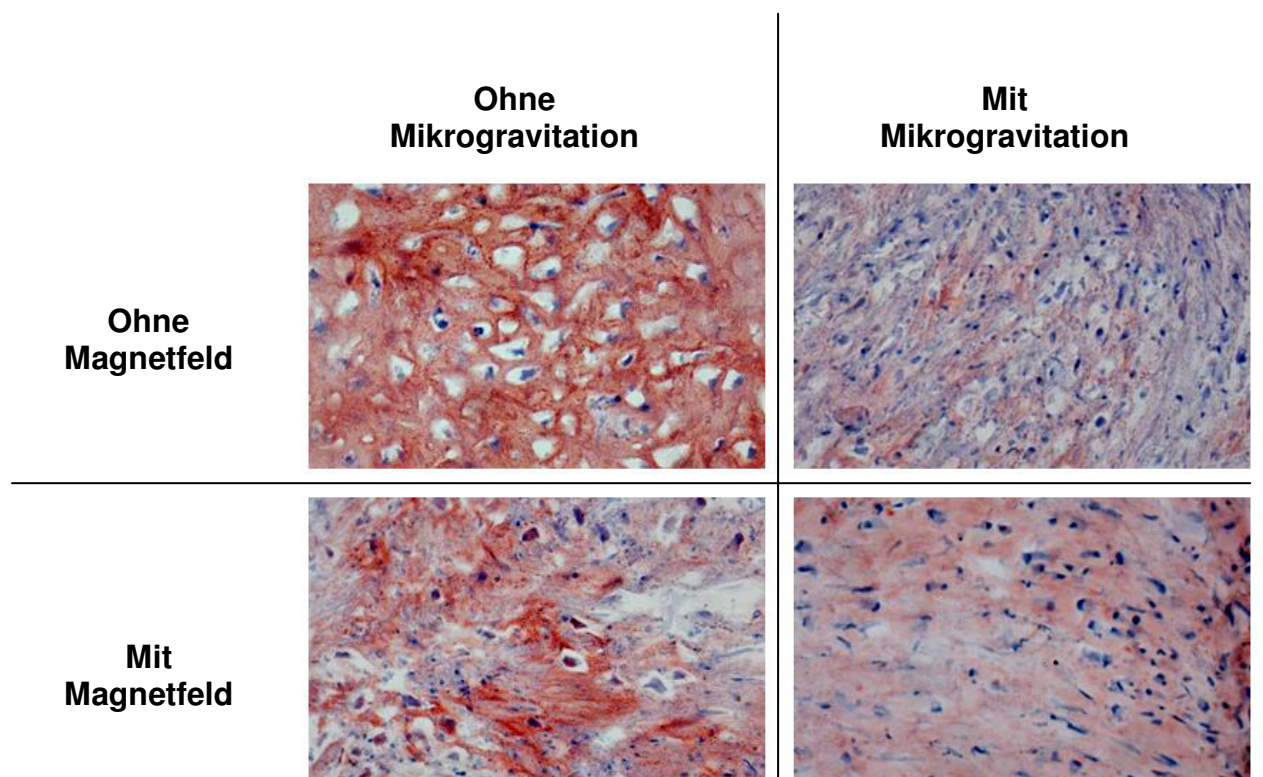
Auch in der Toluidinblau Färbung war, wie in den anderen Färbungen zuvor, keine proteoglykanspezifische Anfärbung in den Negativkontrollen der Gruppen 1 und 2 sichtbar. Die anderen Gruppen sind entsprechend ihrer Stimulation mit Magnetfeld bzw. Bioreaktor in Abb. 25. dargestellt. Auch in dieser Färbung zeigt sich eine homogene Färbung der Gruppen 3-5, was für einen hohen und gleichmäßigen Proteoglykangehalt spricht. Dagegen zeigt sich in Gruppe 6 abermals eine ungleichmäßige Anfärbung mit geringerer Intensität, was auf den bereits zuvor beschriebenen geringen Gehalt an Proteoglykanen zurückzuführen ist.



**Abb. 25.** Histologischer Vergleich der Toluidinblau-Färbung in einem Ausschnitt der 20-fachen Vergrößerung (G3-G6: Gruppe 3 -6, Balken  $\approx 100 \mu\text{m}$ )

### 3.2.3.5. Kollagen-II Färbung

In der kollagen-II-spezifischen immunhistologischen Färbung zeigte sich in den Negativkontrollen der Gruppen 1 und 2, wie aus der Übersichtsgrafik Abb. 22 hervorgeht, keine Anfärbung. Daher sind Ausschnitte der Pellets der anderen Versuchsgruppen entsprechend ihrer Stimulation mit Magnetfeld bzw. Bioreaktor in Abb. 26. dargestellt. Die kräftigste Anfärbung zeigt sich dabei bei Gruppe 3 und 4 bei ähnlicher Binnenstruktur. Die Pellets, die im Bioreaktor stimuliert wurden zeigen eine geringere Farbintensität, wobei sich das Pellet aus Gruppe ohne EMF-Stimulation weitaus inhomogener präsentiert als das Pellet der Gruppe 5, das zusätzlich im EMF stimuliert wurde.



**Abb. 26.** Histologischer Vergleich der Kollagen II Färbung in einem Ausschnitt der 20-fachen Vergrößerung (G3-G6: Gruppe 3 -6, Balken  $\approx 100 \mu\text{m}$ )



### 3.2.4. Auswertung der qt-RT-PCR

#### 3.2.4.1. Kontrollgruppe (Ø TGF, Ø EMF, Ø SMG)

Die Pellets aus Gruppe 1 wurden weder mit TGF, Magnetfeld noch dem Bioreaktor stimuliert und stellen somit eine Negativkontrollgruppe dar.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	23,01	1,50	-	-
<b>Kollagen II</b>	34,15	1,27	0,67	0,05
<b>Aggrekan</b>	35,00	0,00	0,66	0,04
<b>Kollagen X</b>	35,00	0,00	0,66	0,04
<b>SOX9</b>	27,54	1,64	0,84	0,03

Tab. 12 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 1

#### 3.2.4.2. Kontrollgruppe mit EMF (Ø TGF, mit EMF, Ø SMG)

Die Pellets aus Gruppe 2 wurden nur durch ein Magnetfeld stimuliert. Eine Stimulation mit TGF oder im Bioreaktor fand nicht statt. Auch diese Gruppe agiert als Negativkontrolle.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	22,43	2,27	-	-
<b>Kollagen II</b>	34,03	1,34	0,66	0,09
<b>Aggrekan</b>	35,00	0,00	0,64	0,06
<b>Kollagen X</b>	34,37	0,87	0,65	0,07
<b>SOX9</b>	26,65	2,16	0,85	0,12

Tab. 13 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 2

#### 3.2.4.3. Kontrollgruppe mit TGF (mit TGF, Ø EMF, Ø SMG)

Die Pellets aus dieser Gruppe wurden ausschließlich mit TGF stimuliert und stellen somit eine Kontrollgruppe für die Stimulation mit den anderen Faktoren dar. Diese Gruppe ist für den Vergleich der Auswirkung des Magnetfeldes, des Bioreaktors bzw. der Kombination aus beidem wichtig.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	21,36	2,63	-	-
<b>Kollagen II</b>	20,15	2,16	1,06	0,08
<b>Aggrekan</b>	25,29	2,81	0,85	0,09
<b>Kollagen X</b>	21,76	2,53	0,98	0,05
<b>SOX9</b>	25,48	2,02	0,84	0,04

Tab. 14 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 3

#### 3.2.4.4. EMF-Gruppe (mit TGF, mit EMF, Ø SMG)

Diese Pellets wurden mit TGF und im elektromagnetischen Feld stimuliert und können somit Aufschlüsse auf die Auswirkung des Magnetfeldes auf die Zellen geben.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	20,00	1,07	-	-
<b>Kollagen II</b>	19,05	1,19	1,05	0,07
<b>Aggrekan</b>	25,35	1,14	0,79	0,03
<b>Kollagen X</b>	21,20	1,78	0,95	0,07
<b>SOX9</b>	24,75	1,21	0,81	0,03

Tab. 15 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 4

#### 3.2.4.5. EMF- und SMG-Gruppe (mit TGF, mit EMF, mit SMG)

Die Pellets aus Gruppe 5 wurden sowohl mit TGF als auch im Magnetfeld und im Bioreaktor stimuliert und zeigen somit die Auswirkung einer parallelen Stimulation der Pellets mit beiden Stimuli.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	20,86	1,42	-	-
<b>Kollagen II</b>	22,92	1,93	0,91	0,07
<b>Aggrekan</b>	26,51	1,24	0,77	0,03
<b>Kollagen X</b>	22,35	3,58	0,94	0,09
<b>SOX9</b>	25,18	0,77	0,83	0,05

Tab. 16 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 5

### 3.2.4.6. SMG-Gruppe ( mit TGF, Ø EMF, mit SMG)

Diese Pellets wurden mit TGF und im Bioreaktor stimuliert. Eine Magnetfeldstimulation wurde nicht durchgeführt und somit zeigen sie die Wirkung der simulierten Mikrogravitation auf die Stammzellen.

Gen	CP MW	CP SD	GAPDH-Qu.	GAPDH-Qu. SD
<b>GAPDH</b>	20,67	1,15	-	-
<b>Kollagen II</b>	28,17	3,43	0,74	0,15
<b>Aggrekan</b>	28,77	4,69	0,73	0,11
<b>Kollagen X</b>	23,06	2,81	0,91	0,09
<b>SOX9</b>	25,52	2,42	0,82	0,05

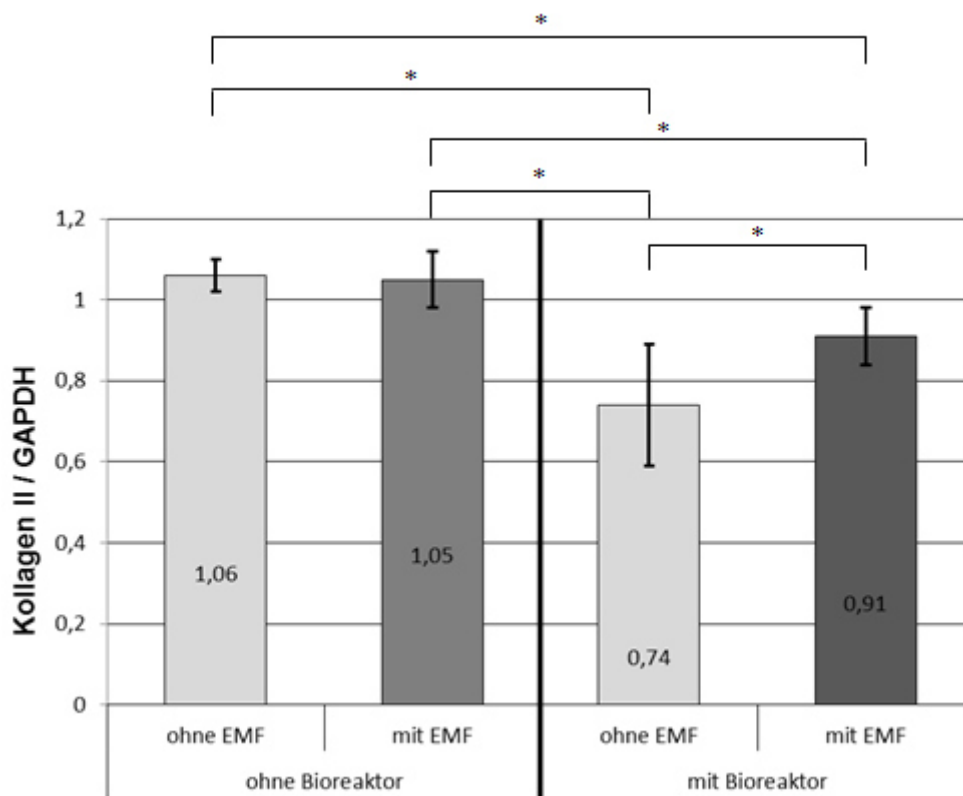
Tab. 17 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 6

### 3.2.5. qt-PCR-Ergebnisse im Diagramm

Im Folgenden werden nun die Gruppen hinsichtlich ihrer Expression der Gene vergleichend gegenübergestellt. Da die Gruppen 1 und 2 als Negativkontrollen mitliefen und weder Kollagen II, Kollagen X noch Aggrekan gebildet haben, sind sie in den folgenden Diagrammen nicht mit abgebildet. Bei den abgebildeten Ergebnissen handelt es sich um den Quotienten aus dem entsprechenden Gen und GAPDH, das als sog. Housekeeping Gen fungierte. Die signifikanten Balken wurden durch ein \* markiert und spiegeln eine Signifikanz in einem Signifikanzintervall von 95% wieder.

### 3.2.5.1. Kollagen II Expression

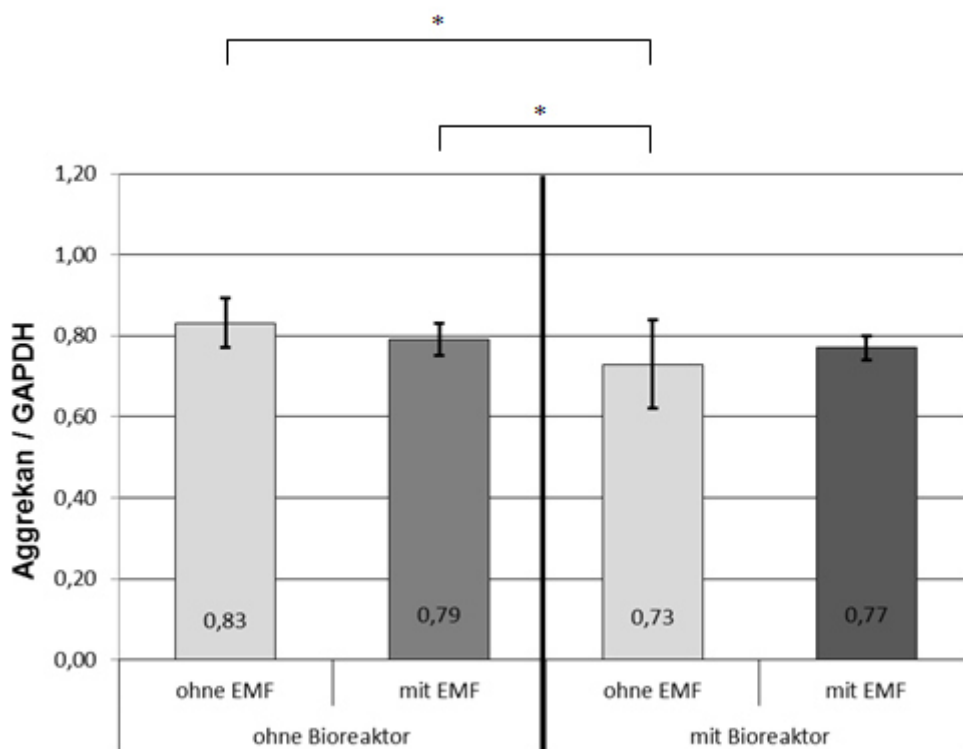
Die Expression von Kollagen II zeigt für die beiden Gruppen, die nicht im Bioreaktor stimuliert worden sind keine signifikanten Unterschiede. Dahingegen sind die Werte für die Gruppen, die unter Mikrogravitation stimuliert und jenen die in normalen Gravitationsbedingungen kultiviert wurden signifikant erniedrigt. Auffällig ist hierbei jedoch, dass die zusätzliche EMF Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der Kollagen II Synthese geführt hat.



**Abb. 27.** Die mRNA Expression von Kollagen Typ II in hMSCs unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder (mit EMF) (5 mT, sinusförmig) oder im Kontrollsystem (ohne EMF), jeweils nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung mit oder ohne Einfluss eines Bioreaktors. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.2.5.2. Aggrekan Expression

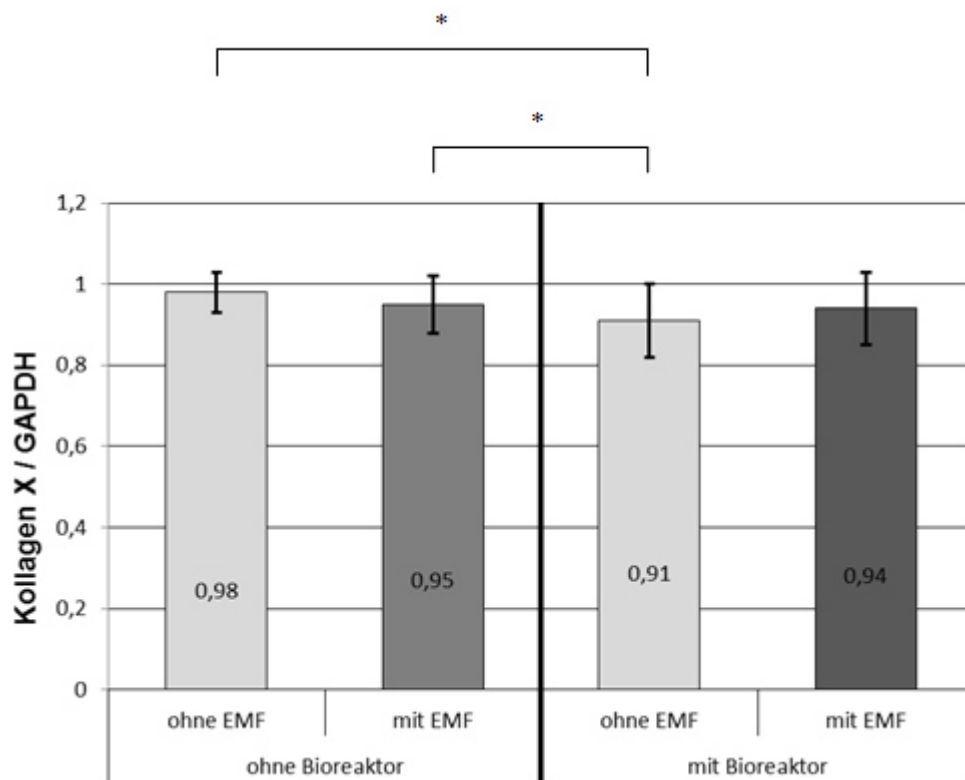
Die Aggrekan-Werte präsentieren sich als Marker für die chondrogene Differenzierung ähnlich wie Kollagen II, jedoch sind die Unterschiede geringer ausgeprägt und einzig die Pellets aus dem Bioreaktor, die nicht befelddet wurden zeigen signifikante reduzierte Expressionslevel im Vergleich zu den beiden Gruppen, die nicht im Bioreaktor stimuliert wurden. Die restlichen Unterschiede sind nicht signifikant.



**Abb. 28.** Die mRNA Expression von Aggrekan in hMSCs unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder (mit EMF) (5 mT, sinusförmig) oder im Kontrollsystem (ohne EMF), jeweils nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung mit oder ohne Einfluss eines Bioreaktors. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.2.5.3. Kollagen X Expression

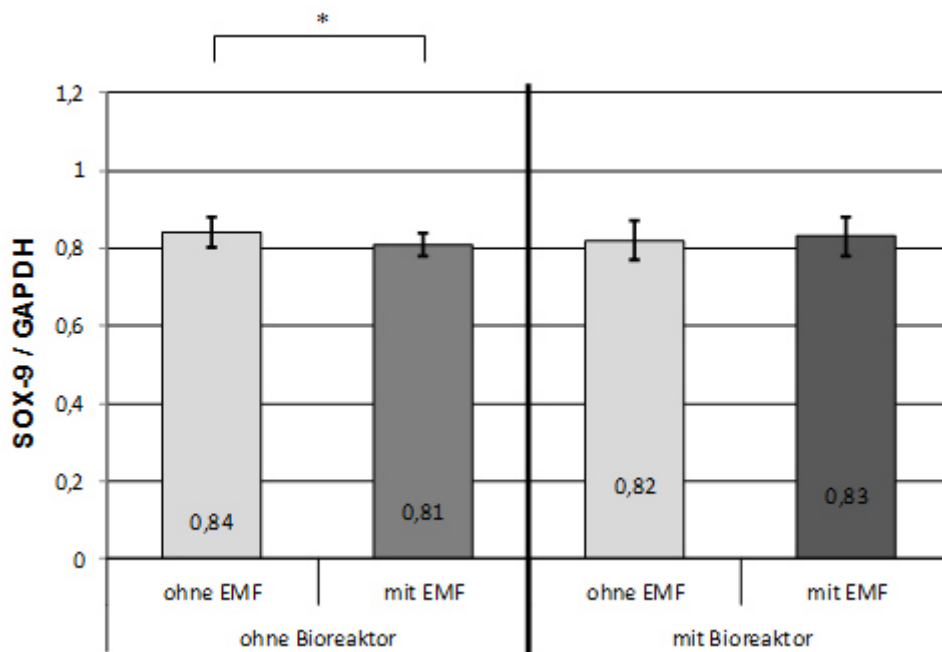
Die Expression von Kollagen X als Indikator für die Zellhypertrophie zeigt abermals eine geringe Reduktion durch die Einwirkung des Bioreaktors, wobei die Reduktion durch gleichzeitige EMF-Stimulation erhöht werden konnte.



**Abb. 29.** Die mRNA Expression von Kollagen Typ X in hMSCs unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder (mit EMF) (5 mT, sinusförmig) oder im Kontrollsystem (ohne EMF), jeweils nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung mit oder ohne Einfluss eines Bioreaktors. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.2.5.4. SOX-9 Expression

Hinsichtlich der Expression von SOX-9 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede durch die Stimulation im Bioreaktor. Allerdings kam es durch die Befeldung im Magnetfeld bei den Pellets die unter normalen Gravitationsbedingungen kultiviert wurden, zu einer signifikanten Abnahme von SOX-9.



**Abb. 30.** Die mRNA Expression von SOX-9 in hMSCs unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder (mit EMF) (5 mT, sinusförmig) oder im Kontrollsystem (ohne EMF), jeweils nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung mit oder ohne Einfluss eines Bioreaktors. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.2.5.5. Kollagen II / Kollagen X

Zur Beurteilung der Expression von Kollagen II im Verhältnis zu der von Kollagen X wurde ein entsprechender Quotient gebildet, mit dessen Hilfe sich die chondrogene Differenzierung im Verhältnis zur osteogenen abschätzen lässt.

	Kollagen II	Kollagen X	Quotient	SD
<b>Gruppe 3</b>	1,06	0,98	1,08	0,08
<b>Gruppe 4</b>	1,05	0,95	1,12	0,15
<b>Gruppe 5</b>	0,91	0,94	0,98	0,17
<b>Gruppe 6</b>	0,74	0,90	0,83	0,20

Tab. 18 PCR-Ergebnisse der Hauptversuche für Gruppe 1

Durch die Stimulation im Bioreaktor kommt es zu einem reduzierten Quotienten, der ohne EMF Stimulation signifikant ist. Auffällig ist hierbei, dass sowohl bei den Pellets mit als auch bei denen ohne Bioreaktorstimulation, der Quotient durch die Befeldung gesteigert werden konnte.

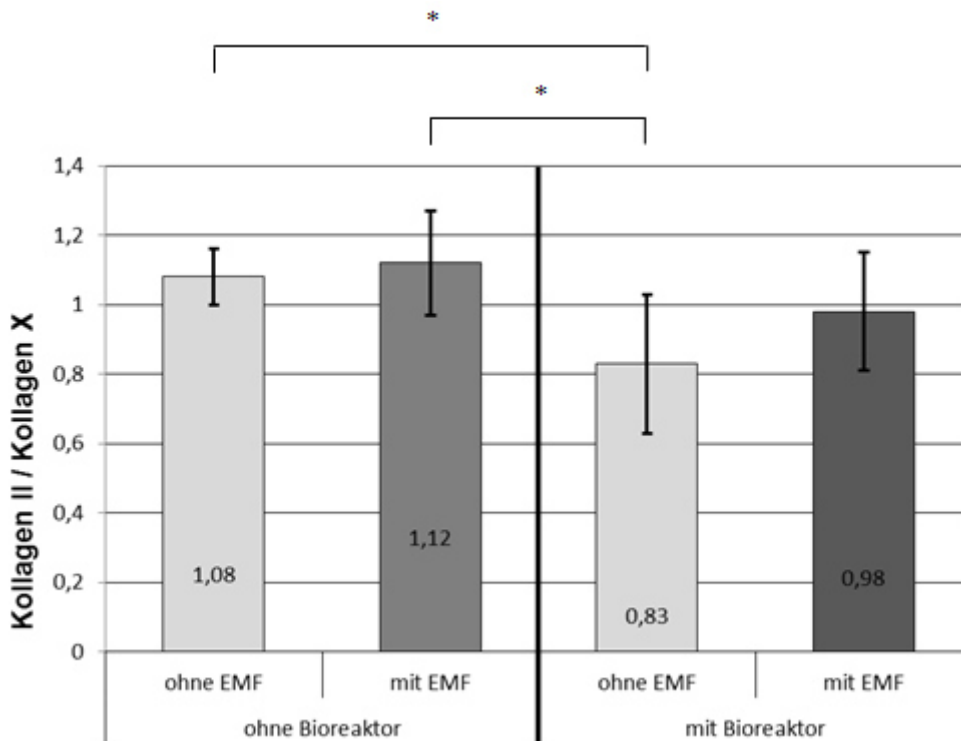


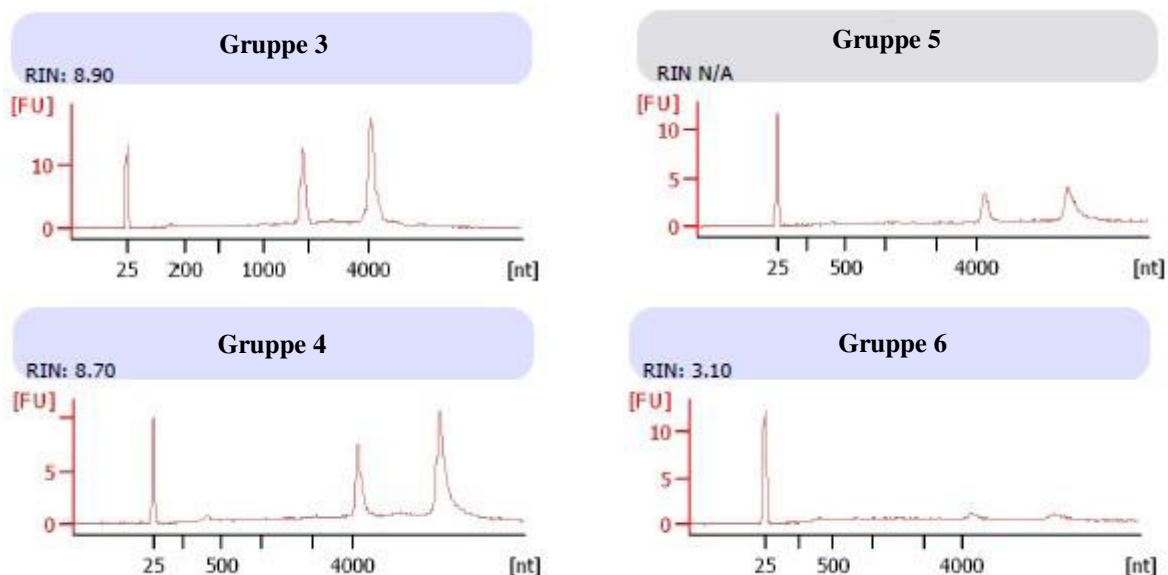
Abb. 31. Die mRNA Expression von Kollagen Typ II / Kollagen Typ X in hMSCs unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder (mit EMF) (5 mT, sinusförmig) oder im Kontrollsystem (ohne EMF), jeweils nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung mit oder ohne Einfluss eines Bioreaktors. (\*  $p < 0,05$ )



### 3.2.6. Bioanalyser und Microarray

#### 3.2.6.1. Bioanalyser

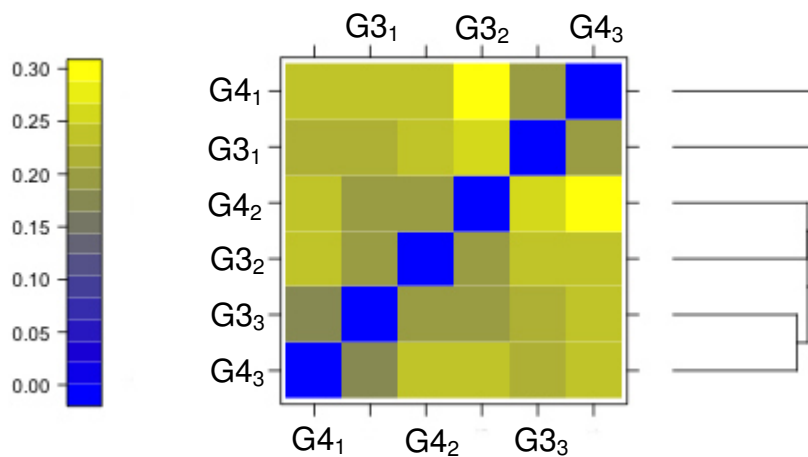
Die Analyse im Bioanalyser ermöglicht es die Integrität der RNA zu ermitteln. Dies geschieht durch die Bildung des RIN-Wertes (RNA Integrity Number), der einen Wert zwischen 1 und 10 einnehmen kann, wobei der Wert 10 für eine vollständig intakte und 1 für eine entsprechend abgebaute und somit nicht mehr verwertbare RNA steht. Die RIN-Werte sollten für eine weitere Untersuchung im Microarray möglichst hoch sein und es sollten sich 2 typische Peaks im Bereich der rechten Diagrammhälfte zeigen. In den Bioanalyser-Untersuchungen zeigte sich, dass die RNA-Integrität nur in den jeweils 3 Proben der Gruppe 3 (nur TGF) und Gruppe 4 (TGF und EMF) den Anforderungen für eine Microarray-Genexpressionsuntersuchung entsprach. Folglich war es durch die Microarray-Untersuchung möglich den in der PCR nicht nachweisbaren Effekt des EMF bei fehlender Mikrogravitation auf genetischer Ebene näher zu beleuchten. Auf Grund der ungenügenden RIN-Werte der anderen beiden Gruppen war eine Untersuchung des EMF-Effektes unter simulierter Mikrogravitation im Microarray leider nicht möglich. In Abb. 32. sind die entsprechenden Bioanalyser-Diagramme mit dem dazugehörigen RIN-Werten dargestellt.



**Abb. 32** Sichtbar sind die 4 Gruppen die im Bioanalyser untersucht wurden. Bei Gruppe 3 und 4 zeigen sich RIN-Werte knapp unter 9 und 2 deutliche Peaks im rechten Abschnitt. In Gruppe 5 und 6 war der RIN-Wert sehr niedrig bzw. nicht nachweisbar und die Peaks nur sehr gering ausgeprägt.

### 3.2.6.2. Microarray

Die Auswertung wurde mit Hilfe des GeneChip-Scanners und der ArrayQualityMetrics-Software durchgeführt und eine Heatmap angelegt. Anhand dieser Heatmap zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Proben der Gruppe 3 und Gruppe 4, sodass sich die in der PCR beobachtete Ähnlichkeit beider Gruppen bestätigte. Leider konnte der Effekt nach Stimulation im Bioreaktor auf Grund mangelhafter RNA-Integrität nicht näher untersucht werden.



**Abb. 33** Heatmap der Microarray-Untersuchung. Zu sehen sind die je 3 Pellets der Gruppe 3 und 4 (G3, G4). Auffällig ist das Baumdiagramm auf der rechten Seite, das die Ähnlichkeit der Präparate zueinander zeigt und dabei finden sich sogar größere Gemeinsamkeiten zwischen den Pellets beider Gruppen als innerhalb derselben Gruppe.

### 3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse der PCR Untersuchungen, so zeigt sich, dass die Kollagen Typ II und Kollagen Typ X Synthese in den Gruppen ohne simulierte Mikrogravitation größer ist. Wobei das Magnetfeld in den SMG-Gruppen zu einer erneuten Zunahme der Kollagen-Werte führt.

Dahingegen sind die Werte des Markers SOX-9 relativ ausgeglichen und weisen keine großen Unterschiede auf.

Bei Betrachtung des Aggrekanwertes zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den beiden Kollagen Typen II und X. Die Schwerelosigkeit sorgt für eine Abnahme und die

zusätzliche EMF-Stimulation in Mikrogravitation kann diesen scheinbar inhibierenden Effekt wieder etwas anheben.

	<b>Kollagen II</b>	<b>Kollagen X</b>	<b>SOX-9</b>	<b>Aggrekan</b>
<b>Gruppe 3</b> (EMF -, SMG -)	1,06	0,98	0,84	0,83
<b>Gruppe 4</b> (EMF +, SMG -)	1,05	0,95	0,81	0,79
<b>Gruppe 5</b> (EMF +, SMG +)	0,91	0,94	0,83	0,77
<b>Gruppe 6</b> (EMF -, SMG +)	0,74	0,90	0,82	0,73

Tab. 19 Zusammenfassende Übersicht der PCR-Ergebnisse

Die Beobachtungen der PCR-Analyse zeigen sich auch in den histologischen Untersuchungen. So ist die proteoglykanspezifische Anfärbung ebenso wie die immunhistochemische Kollagen Typ-II-Färbung am stärksten in den Gruppen, die keiner Form der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren. Wobei die zusätzliche Magnetfeldstimulation scheinbar zur vermehrten Synthese von Proteoglykanen und Kollagen Typ II führt.

Da das Magnetfeld bei der Gruppe ohne SMG keine wirklich relevanten Unterschiede erzeugte, während es in den Mikrogravitationsgruppen durchaus signifikante Auswirkungen durch das Magnetfeld gab wollten wir dies genauer untersuchen und führten eine Microarray-Untersuchung durch. Diese konnte zeigen, dass es zwischen den Proben der Gruppe 3 und 4 kaum Unterschiede hinsichtlich der Genexpression gibt.

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Zellkultur

#### 4.1.1. Einsatz von Stammzellen und Wachstumsfaktoren

Knorpelläsionen sind eine häufig auftretende Gelenkschädigung, die heutzutage durch Methoden der regenerativen Medizin, meist durch Mikrofrakturierung oder bei größeren Defekten durch den autologen Transfer von Chondrozyten behandelt wird [Brittberg et al., 1994; Rudert et al., 1998; Vogt et al., 2007]. Dabei werden die Zellen aus einem nicht artikulierenden Gelenkbereich entnommen und kultiviert. Jedoch führt dies zum Verlust der Chondrogenität der Zellen [Martinek et al., 2003]. Aus diesem Grund wird seit geraumer Zeit versucht, stattdessen humane mesenchymale Stammzellen zu verwenden, die wie bereits beschrieben ebenfalls chondrogenes Potential besitzen [Pittenger et al., 1999; Caplan et al., 2007]. Hierfür ist jedoch der Einsatz von Wachstumsfaktoren notwendig, damit die Differenzierung in die gewünschte Zelllinie gesteuert werden kann. Daher wurden auch diese Versuche mit Stammzellen durchgeführt und die Stammzellen je nach Versuchsgruppe mit FGF-2 und TGF- $\beta$ 3 stimuliert, da gezeigt werden konnte, dass die Stimulation mit FGF-2 das chondrogene Potential steigert und TGF- $\beta$ 3 eine wichtige Rolle im Bereich der Chondrogenese spielt [Solchaga et al., 2005; Joyce et al., 1990; Thorp et al., 1992]. In den eigenen Versuchen konnte die Bedeutsamkeit des TGF- $\beta$ 3 bestätigt werden, da nur in den Versuchsgruppen mit Stimulation ein signifikanter Nachweis von Kollagen II erfolgen konnte. Hinsichtlich der Wirksamkeit von FGF-2 kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, da hierfür keine Kontrollgruppe ohne FGF-2 Stimulation vorgesehen war.

### 4.2. Effekte durch die Magnetfeldstimulation

Magnetfelder sind in der Forschung schon lange bekannt. Erstmals wurden sie 1865 durch den schottischen Physiker James Clerk Maxwell beschrieben [Maxwell et al., 1865]. Während man in Europa und der damaligen Sowjetunion weiter mit Magnetfeldern, vor allem im medizinischen Bereich forschte, wurde die Arbeit mit elektromagnetischen Feldern in den Vereinigten Staaten als unlautere Wissenschaft bezeichnet und im Jahre 1910 folgte dort die vollständige Streichung aus dem medizinischen Curriculum. Dadurch gerieten die Magnetfelder zunächst in Vergessenheit und finden sich erst in Arbeiten der späten 60er bis frühen 70er Jahre wieder, in denen über eine verbesserte Frakturheilung oder die Behandlung von Pseudarthrosen berichtet wird. Führend sind zu dieser Zeit vor allem sowjetische

---

Forscher, die Magnetfelder über lange Zeit auch bei ihren Sportlern mit Erfolg einsetzten und eine deutlich gesteigerte Reaktionsfähigkeit beschrieben [Gordon et al., 2007; Bassett et al., 1989; Wahlström et al., 1984].

#### 4.2.1. Wirkmechanismus der Magnetfelder

Auch wenn die Magnetfelder schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt waren, konnte man lange Zeit den Wirkmechanismus auf Zellen und die beschriebenen Effekte nicht erklären. Einen Ansatzpunkt lieferte der erstmals von den Geschwistern Jaques und Pierre Curie beschriebene piezoelektrische Effekt [Kleber et al., 2010], der später erstmals am Knochen durch die Arbeitsgruppe des japanischen Forschers Fukada nachgewiesen werden konnte [Fukada et al., 1957]. Der piezoelektrische Effekt stellt einen Zusammenhang zwischen der Form eines Festkörpers und seiner elektromagnetischer Ladung her. Hierbei kann ein direkter und indirekter Effekt unterschieden werden. So führt die Deformierung eines festen Körpers zu einer Ladungsveränderung (direkter piezoelektrischer Effekt) bzw. eine Ladungsveränderung zu einer Deformierung eines festen Körpers (indirekter piezoelektrischer Effekt). Dieser Effekt ist für die Natur und somit auch für den menschlichen Organismus von großer Bedeutung, da dies eine Möglichkeit ist physische Kräfte in elektromagnetische Informationen zu translatieren und umgekehrt.

Versuche in den späten 80er und frühen 90er Jahren durch den sowjetischen Forscher Lednev gaben Aufschluss über mögliche zelluläre und molekulare Grundlagen der EMF Wirkung. So stellte Lednev fest, dass Magnetfelder die Eigenschaften von Magnesium, Kalium und insbesondere von Kalzium und deren Bindungsproteinen beeinflussen können [Lednev et al., 1991]. Lednev erklärt dies durch das Phänomen der Eigenfrequenz. Damit wird die Umlaufzeit für Teilchen, in der Regel Elektronen, um das entsprechende Atom bezeichnet. Versuche zeigen, dass bei einer Frequenz von 15.3-16.3 Hz der Fluss von Kalzium-Ionen in Knochenzellen am Größten ist [Fitzsimmons et al., 1994]. Diese Frequenz entspricht in etwa der Eigenfrequenz (auch Zyklotronfrequenz genannt) von freien Calcium-Ionen, die bei etwa 16 Hz liegt [Sandweiss et al., 1990]. Dies führt zur Beeinflussung der Bindungsfähigkeit von Calcium-bindenden Proteinen mit Calcium, und zwar insbesondere von Calcium-Calmodulin abhängigen Kinasen und der Proteinkinase, wodurch es zu einer verstärkten Calcium-Wirkung in den Zellen kommt und Calcium-abhängige Signalkaskaden verstärkt ablaufen [Hendee et al., 1996]. Diese Signalkaskaden scheinen eine induktive Funktion im Rahmen der Chondrogenese zu übernehmen [Tomita et al., 2002; Matta et al., 2008, Chang et al., 1999].

#### 4.2.2. Einfluss auf die Chondrogenität auf molekularbiologischer Ebene

In dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen in einem extrem-niederfrequenten Magnetfeld mit dem Ziel die chondrogene Differenzierung positiv zu beeinflussen stimuliert. Dieser positive Effekt wurde in mehreren Studien beschrieben, wobei es auch Studien gibt, die diesen Effekt nicht darstellen konnten.

So zeigte sich bei Versuchen mit einem speziellen Ossifikationsmodell am Rattenknochen mit demineralisierter Knochenmatrix eine gesteigerte Synthese der kartilaginären Marker Kollagen Typ II und Aggrecan im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen konnten auch in zwei voneinander unabhängigen Studien an humanen Chondrozyten gezeigt werden, die unter der Stimulation in einem extrem-niederfrequenten Magnetfeld eine erhöhte Expression des Markers Kollagen Typ II aufwiesen [Pezzetti et al., 1999; Indouraine et al., 2001]. Während wir im Rahmen unserer Vorversuche mit Chondrozyten noch einen positiven Effekt auf die Aggrecansynthese durch das Magnetfeld feststellen konnten, zeigten sich in den Hauptversuchen mit Stammzellen aus Passage 5 keine signifikanten Unterschiede durch alleinige Stimulation im elektromagnetischen Feld. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten, die zu dem gleichen Resultat kamen [Mayer-Wagner et al., 2011].

Auch andere Forschungsgruppen konnten bei ihren Versuchen keine Auswirkungen auf die Chondrogenese feststellen. So konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmidt-Rohlfing an gesunden Chondrozyten, die bei Arthrosepatienten entnommen wurden keinen positiven Effekt durch Magnetfelder feststellen, auch bei Verwendung verschiedener Magnetfeldformen [Schmidt-Rohlfing et al., 2008]. Dabei erachtet er es jedoch auch als möglich, dass die Tatsache, dass bei den Versuchen gesundes Knorpelgewebe untersucht wurde, eine wesentliche Rolle spielt und verweist auf eine Arbeit von Bobacz, die 2006 bei Versuchen mit Knorpelzellen vom Kalb bzw. Rind feststellten, dass der EMF-Effekt altersabhängig ist. So konnte gezeigt werden, dass der Inhibierung der Knorpelsynthese durch IL-1 $\beta$  bei jungen Tieren durch die EMF-Wirkung entgegengewirkt werden konnte, wohingegen der Effekt bei alten Tieren nicht zu beobachten war [Bobacz et al., 2006].

Betrachtet man unsere und andere Beobachtungen, so kann man vermuten, dass die Wirkungen von Magnetfeldern immer noch nicht ganz verstanden sind und viele Faktoren eine Rolle spielen. Auf Grund der oben beschriebenen Studienlage liegt es nahe, dass Magnetfelder in der Lage sind geschwächte kartilaginäre Zellen zu unterstützen, sofern die Zellen per se noch genügend chondrogenes Potential

---

besitzen. Puetzer konnte zeigen, dass dies womöglich unter anderem auf eine Aktivierung des `biocarta_alk_pathways`, der für die Expression von vielen chondrogenen und osteogenen Faktoren wie BMP 2,4,5 und 7 sowie der TGF- $\beta$ -Familie zuständig sind, zurückzuführen ist [Puetzer et al., 2010].

#### **4.2.3. Einfluss auf histologischer Ebene**

Betrachtet man die histologischen Präparate der reinen EMF-Pellets so zeigen sich hier allenfalls marginale Unterschiede. Es zeigt sich weiterhin ein reichlicher Gehalt an Proteoglykanen und Kollagen II im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung ist mit den PCR und Microarray Ergebnissen übereinstimmend.

#### **4.2.4. Einfluss auf die terminale Hypertrophie**

Magnetfelder haben nicht nur auf die chondrogene Differenzierung eine stimulierende Wirkung, sondern auch auf die osteogene. So konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss des osteogenen Stimulus BMP-2 knochenspezifische Marker wie die alkalische Phosphatase und Osteocalcin bei Versuchen mit Stammzellen sowohl aus dem Knochenmark, als auch dem Fettgewebe stammend, im Magnetfeld vermehrt exprimiert waren [Ongaro et al., 2014]. In unseren Versuchen zeigte sich bei Verwendung des chondrogenen Differenzierungsmodells eher ein leichter Abfall der Kollagen X Expression unter EMF-Stimulation, der jedoch nicht signifikant war. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Versuchen, die ebenfalls eine Verminderung von Kollagen Typ X feststellten [Mayer-Wagner et al., 2011]. Somit kann man mutmaßlich davon ausgehen, dass eine geringe Reduktion der terminalen Hypertrophie durch das EMF alleine möglich ist, sofern keine osteogene Differenzierung induziert wird, jedoch ist dieser Effekt für das Ziel des Knorpelersatzes zu gering ausgeprägt und bedarf weiterer Methoden um die Hypertrophie zu reduzieren, was Ziel dieser Arbeit war.

#### **4.2.5 Kanzerogenität von Magnetfeldern**

Der Einsatz elektromagnetischer Felder wird viel diskutiert und in den letzten Jahren gab es immer wieder Studien, die von einer mutmaßlich genotoxischen Wirkung von Magnetfeldern sprechen. So berichtet Ivancsits bei seinen Versuchen mit humanen,

---

diploiden Fibroblasten unter der Stimulation mit einem extrem-niederfrequenten Magnetfeld vermehrt DNS-Strangbrüche beobachtet zu haben [Ivancsits et al., 2002]. In anderen Studien wird ein erhöhtes Leukämie-Risiko von Kindern, die in der Reichweite von Radio-Sendern aufgewachsen sind und damit einer vermehrten Emission hochfrequenter elektromagnetische Strahlung ausgesetzt waren, angeführt [Michelozzi et al., 2002; Ha et al., 2007]. Kritiker dieser Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Genotoxizität nicht in allen Experimenten nachgewiesen werden konnte [McCann et al., 1993; Murphy et al., 1993]. Auch ein fehlender kausaler Mechanismus zwischen Magnetfeldern und der Leukämieentstehung wird bemängelt, zumal eine Vielzahl der Erkrankungen nicht durch die Einwirkung von elektromagnetischen Wellen begründet werden können [Schüz et al., 2008; Poole et al., 1991].

Auf Grund der unklaren Studienlage wurden Magnetfelder durch die Internationale Gesellschaft für Krebsforschung als potentiell kanzerogen eingestuft [ICNIRP, 2010]. Die Resultate in unseren Versuchen, insbesondere bei Betrachtung der Microarray-Analyse sprechen eher gegen eine kanzerogene Wirkung. So konnte in den Gruppen mit und ohne Magnetfeldstimulation auf Ebene der Genexpression kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

### **4.3. Effekte durch die (simulierte) Mikrogravitation**

Die Stimulation in simulierter Schwerelosigkeit ist im Vergleich zur Magnetfeldstimulation eine relativ junge Methode und wird derzeit nach aktuellem Wissensstand medizinisch nur in der Forschung angewendet. Sie geht zurück auf Forschungsarbeiten der NASA aus den 90er Jahren und soll die Erforschung der Schwerelosigkeitseffekte ohne teure Spaceshuttle-Mission ermöglichen. Insgesamt muss man berücksichtigen, dass hier manche Studien im Weltraum durchgeführt wurden, während andere in einem der verschiedenen SMG-Bioreaktoren stattfanden. Dies erschwert natürlich die Vergleichbarkeit, wobei eine vergleichende Studie von Stamenkovic zeigen konnte, dass die Effekte der simulierter Schwerelosigkeit denen der echten entsprechen, allerdings etwas geringer ausgeprägt sind [Stamenkovic et al., 2010].



#### 4.3.1. Effekte auf die Chondrogenität auf molekularbiologischer Ebene

Die Studienlage ist hier nicht homogen, da sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Chondrogenese beschrieben sind.

So berichtet Ulbrich aus einem Versuch mit humanen Chondrozyten von einer vermehrten Expression der knorpelspezifischen Marker Aggrekan und Kollagen II in SMG-stimulierten Zellen unter initialer Monolayer-Kultur. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in den Gruppen mit Mikrogravitation die Ausbildung von 3-dimensionalen Kulturen beobachtet wurden, die im Verlauf an Dicke zunahmten. Zudem wurde festgestellt, dass der Gehalt an Kollagen Typ II, Aggrekan und Chondroitinsulfat in den Mikrogravitationsgruppen erhöht war [Ulbrich et al., 2010]. Auch Freed zeigte in seinen Versuchen aus dem Jahr 1997 eine Zunahme des prozentualen Anteils von Kollagen II am Gesamtkollagen unter simulierter Schwerelosigkeit [Freed et al., 1997].

Demgegenüber steht die Beobachtung von Duke aus dem Jahr 1995, der in den Versuchen mit embryonischen Mauszellen eine Inhibierung der Chondrogenese beobachtete [Duke et al., 1995]. Dies wird durch die Beobachtungen von Stamenkovic bestätigt, der Parallelversuche im Weltraum und auf der Erde mit simulierter Schwerelosigkeit durchführte und eine deutliche Abnahme der absoluten Expression von Aggrekan, Kollagen Typ II und Kollagen Typ I feststellte, wobei jedoch die relative Expression erhöht war [Stamenkovic et al., 2010].

In unseren Versuchen zeigte sich durch die Einwirkung der Schwerelosigkeit eine signifikante Verringerung der Kollagen Typ II-Expressionsrate sowie eine zum Teil signifikant verminderte Aggrekansyntheserate.

#### 4.3.2. Effekte auf histologischer Ebene

In allen Färbungen fällt eine Abnahme der Matrixdichte auf, es zeigen sich viele luftartige Einschlüsse bei deutlich reduziertem Proteoglykangehalt und verminderter Kollagen Typ II Anfärbung. Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen anderer Arbeiten. Die Arbeitsgruppe um Freed führte einen Versuch mit bovinen Chondrozyten durch, bei dem Chondrozyten zunächst für 3 Monate auf der Erde und dann für 4 weitere Monate entweder weiterhin auf der Erde oder auf der MIR im Weltall kultiviert wurden. Auffällig war in der MIR-Versuchsgruppe die Abnahme des Nassgewichts der Präparate bei erhöhtem Wassergehalt [Freed et al., 1997]. Dies

---

spricht dafür, dass die Mikrogravitation für die reduzierte Zelldichte verantwortlich ist. Diese Annahme kann auch durch die Versuche von Stamenkovic bestätigt werden. Dieser wies die Dichteabnahme bei seinem Versuch mit Schweine-Chondrozyten nicht nur im Weltraum, sondern postulierte diesen Effekt auch unter simulierter Mikrogravitation [Stamenkovic et al., 2010].

#### **4.3.3. Effekte auf die terminale Hypertrophie**

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass das Magnetfeld alleine keine ausreichende Wirkung auf die terminale Hypertrophie hat war die Hoffnung, dass der Effekt durch den Einsatz der simulierten Mikrogravitation verstärkt werden kann. Dabei beruhte die Hoffnung auf Beobachtungen, die bereits während der ersten Weltraummissionen gemacht wurden. So berichtet die Arbeitsgruppe von Sibonga von einer Abnahme der Knochendichte im Bereich der Hüften und der Wirbelkörper von mehr als 10% bei manchen Astronauten nach einer durchschnittlichen 6 monatigen Weltraummission [Sibonga et al., 2013]. Auch Carmeliet zeigte, dass die Osteoblastenfunktion unter Schwerelosigkeit reduziert war und vermutete hierbei eine Wirkung auf genetischer Ebene [Carmeliet et al., 1999]. Auch in unserer Arbeit zeigt sich eine zum Teil signifikante Reduktion der Kollagen Typ X Synthese, was die oben genannten Arbeiten bestätigt. Folglich ist die simulierte Schwerelosigkeit in der Lage die terminale Hypertrophie einzuschränken, jedoch zu dem Preis, dass auch die Kollagen II Synthese, sprich die Chondrogenese darunter leidet.

#### **4.4. Effekte durch die Kombination von EMF und SMG**

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich entweder mit der Wirkung von Magnetfeldern oder der (simulierten) Schwerelosigkeit mit der Auswirkung auf Chondrogenität von Chondrozyten und chondrogen differenzierten Stammzellen. Allerdings gibt es bislang keine Arbeit, die beide Methoden miteinander kombiniert hat.

##### **4.4.1. Effekte auf die Chondrogenität**

Betrachtet man die Expression der kartilaginären Marker Aggrekan und Kollagen Typ II, so zeigt sich, dass nach Addition des Magnetfeldes zur Schwerelosigkeit diese Proteine wieder vermehrt synthetisiert werden, auch wenn sie nicht ganz das Expressionsniveau der reinen EMF-Stimulation erreichen. Diese Beobachtung wirft natürlich die Frage auf, warum hier nun ein positiver Effekt zu sehen ist, während man ohne die Mikrogravitation keinen Effekt beobachten konnte. In der Literatur finden sich hierfür zahlreiche Erklärungsmöglichkeiten. Um mögliche

---

Wechselwirkungen zu verstehen muss man detailliert betrachten, welche Auswirkungen die jeweiligen Stimuli auf die Zellen haben.

#### **4.4.1.1. Zellstress, MAP-Kinasen und Hitzeschockproteine**

So konnte Sheyn et al. zeigen, dass Schwerelosigkeit auch Stress für die Zelle bedeutet, indem er bei seinen Versuchen mit humanen mesenchymalen Stammzellen nachwies, dass die SMG zur Hochregulierung von 7 Apoptosegenen und somit zum vermehrten Zelltod führte [Sheyn et al., 2010].

Ein möglicher Ansatzpunkt könnten hierbei die MAP-Kinasen sein. Diese können in die drei Untergruppen der extrazellulär signal-regulierten Kinasen ERK-1/2, der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase und die c-JUN N-Terminalen Kinasen gegliedert werden. Loesberg sieht hierfür vor allem die vermehrt ablaufenden Signalkaskaden der MAP-Kinasen JNK/SAPK und p38, die sonst typischerweise bei erhöhtem Zellstress anzufinden sind als ursächlich, da die Mikrogravitation in seinen Versuchen mit Fibroblasten zu einer vermehrten Phosphorylierung und somit Aktivierung eben jener MAP-Kinasen führte [Loesberg et al., 2008]. Jedoch zeigte sich dieser Effekt auf die MAP-Kinasen auch für das Magnetfeld. Somit dürfe die Ursache des gegenläufigen EMF-Effektes auf die SMG nicht mit den MAP-Kinasen zusammenhängen [Goodman et al., 2002].

Eine andere Möglichkeit unsere Beobachtungen zu erklären sind in der Literatur erwähnte Einflüsse auf die Expression von Hitzeschockproteinen. Kumei beschreibt in seiner Arbeit eine Reduktion der Hitzeschock-Proteine HSP 70 und HSP 47 durch die Einwirkung von Mikrogravitation auf Ratten-Osteoblasten [Kumei et al., 2003]. HSP 70 ist für die Faltung, den Zusammenbau und das erneute Falten fehlgefalteter bzw. aggregierter Proteine notwendig und wird als Kondensator, der destabilisierende Veränderungen puffert bezeichnet [Mayer et al., 2005]. HSP47 gilt als ein kollagen-spezifisches Chaperon und hat eine besondere Bedeutung für die Bildung von Prokollagen [Nagata et al., 1996]. Masuda konnte in Versuchen mit Mausembryos zeigen, dass die Expression von HSP47 eng mit der von Kollagen I und II korreliert ist [Masuda et al., 1998]. Dies lässt vermuten, dass durch Verminderung dieser bedeutsamen Regulatoren die Kollagensynthese auch vermindert sein könnte, was sich in den Ergebnissen hinsichtlich Kollagen II und Kollagen X auch in dieser Arbeit widerspiegelt. Der Einfluss elektromagnetischer Felder auf die oben genannten Hitzeschockproteine wurde bislang noch nicht untersucht, jedoch konnte gezeigt werden, dass durch Magnetfelder unter anderem die Hitzeschockproteine 70 und 90 induziert werden, was sowohl in früheren

---

Arbeiten, als auch durch die Arbeitsgruppe um Goodman gezeigt wurde [Goodman et al., 2002]. Thermische Effekte werden dabei ausgeschlossen, was auch durch die Arbeit von Pomerei bekräftigt wird, der eine nicht-thermische Hitzeschockreaktion durch Mikrowellen untersucht hat [de Pomerai et al., 2000]. Somit könnte durchaus die durch das Magnetfeld wieder erhöhte Expression der Hitzeschockproteine zu einer verminderten Apoptoserate und somit vermehrten Kollagen-Synthese führen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen von Garip untermauert, die durch die Einwirkung eines extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldes eine vermehrte Freisetzung von Hitzeschockproteinen und somit eine verringerte Apoptoserate zu verzeichnen hatte [Garip et al., 2010].

#### **4.4.2. Effekte auf histologischer Ebene**

Die Beobachtungen der PCR Ergebnisse spiegeln sich auch histologisch wieder. Vergleiche mit anderen Studien sind wie bereits zuvor erwähnt nicht möglich. Man sieht insgesamt durch die zusätzliche EMF-Wirkung einen erhöhten Proteoglykangehalt und auch die Kollagen II-Anfärbung ist nun wieder deutlicher, auch wenn diese nicht das Niveau der anderen Gruppe ohne SMG Stimulation erreicht.

#### **4.4.3. Effekte auf die terminale Hypertrophie**

Die Vermutung zu Beginn des Versuches war, dass durch die zusätzliche Einwirkung der simulierten Schwerelosigkeit der inhibierende Effekt auf die Kollagen X Synthese verstärkt werden kann.

Betrachtet man isoliert die Kollagen X Synthese, so kann man auf Grund der Ergebnisse behaupten, dass durch die Kombination dieser beiden Methoden die Kollagen Typ X Synthese weiter reduziert werden kann. Dies ist wohl hauptsächlich auf die insgesamt deutliche Kollagen Synthese unter Mikrogravitationsbedingungen zurückzuführen, die bereits von Stamenkovic beobachtet wurde [Stamenkovic et al., 2010]. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass auch das Kollagen II verringert war, sodass man bei Betrachtung des Kollagen II/Kollagen X Quotienten einen vermehrten Rückgang der Chondrogenität als Preis für die verminderte Hypertrophie verzeichnen musste.

#### 4.5. Zusammenfassende Interpretation

Neben der Mikrofrakturierung stellt die autologe Chondrozytentransplantation ein wichtiges Verfahren zur Behandlung von Knorpelläsionen dar. Jedoch verlieren die Chondrozyten bei der dazu notwendigen Expansion nach Entnahme und vor Replantation ihre chondrogenen Eigenschaften. Daher wäre der Einsatz von humanen mesenchymalen Stammzellen ein neuer Ansatz um Zellen mit chondrogenen Eigenschaften zu implantieren. Denn die HMSC sind in der Lage durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren chondrogen zu differenzieren. Niederfrequente elektromagnetische Felder könnten dabei die Differenzierung unterstützen.

In dieser Arbeit wurden erstmalig die beiden Methoden Magnetfeldstimulation und simulierte Mikrogravitation kombiniert. Auf Grund der Studienlage war diese Kombination vielversprechend. Auf der einen Seite das Magnetfeld, das bereits unter gewissen Voraussetzungen zeigen konnte, dass es in der Lage ist, die Chondrogenität von Stammzellen zu erhöhen und dabei gleichzeitig zu einer geringen Reduktion der Hypertrophie führen kann [Mayer-Wagner et al., 2011]. Auf der anderen Seite die simulierte Schwerelosigkeit, die in den letzten Jahren immer mehr Einzug in die Forschung erhält und auf Grund der Beobachtungen in realer und simulierter Schwerelosigkeit diese unerwünschte Verknöcherung durch Inhibierung osteogener Differenzierung am Ende der enchondralen Ossifikation bekämpfen könnte.

Die Stammzellen wurden zunächst mit FGF-2 kultiviert, ehe sie in eine Pelletkultur überführt und mit TGF- $\beta$ 3 die chondrogene Differenzierung stimuliert wurde. Die Kultivierung erfolgte dabei in mehreren Gruppen und unterschied sich hinsichtlich der Faktoren, die miteinander kombiniert wurden: Mit oder ohne Magnetfeld, mit oder ohne simulierter Mikrogravitation. Nebenbei liefen noch Kontrollgruppen ohne TGF- $\beta$ 3 Stimulation, die jedoch keine nachweisbare Chondrogenität zeigten. Die molekularbiologische und histologische Untersuchung sowie Auswertung der Pellets erfolgte nach 21 Tagen.

Bei den chondrogen differenzierten HMSC zeigte sich, sofern sie der simulierten Mikrogravitation ausgesetzt waren, eine reduzierte Expression von Kollagen Typ X. Ferner erfolgte durch die Stimulation im Bioreaktor eine reduzierte Kollagen Typ II-Synthese. Hierbei war jedoch die Abnahme der Kollagen Typ II Synthese stärker ausgeprägt als die von Kollagen Typ X wie durch den reduzierten Kollagen Typ II/Kollagen Typ X Quotienten hervorgeht. Die Magnetfeldstimulation ergab, wie

---

bereits zuvor beobachtet, bei humanen mesenchymalen Stammzellen der Passage 5 keinen nachweisbaren Effekt. Dies konnte auch durch eine Microarrayanalyse bestätigt werden, die keine genetischen Expressionsveränderungen nachweisen konnte. Bei den Proben, die im Bioreaktor der simulierten Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, zeigte sich jedoch durch die Kombination mit dem Magnetfeld eine positive Wirkung auf die Kollagen Typ II Synthese und ein erhöhter Kollagen Typ II/Kollagen Typ X Quotient.

Somit bleibt festzuhalten, dass der Einsatz der simulierten Mikrogravitation, in der Form wie wir sie angewendet haben, zu einer verringerten Hypertrophie der chondrogen differenzierten Stammzellen führt. Darüber hinaus bringt die Stimulation in einem Mikrogravitationsbioreaktor keinen Vorteil für die chondrogene Differenzierung, da es hier zu einer signifikanten Abnahme der Kollagen Typ-II-Synthese kommt. Das Magnetfeld ist jedoch in der Lage diesen Effekt teilweise zu revidieren. Magnetfelder haben jedoch scheinbar unter optimalen Versuchsbedingungen keinen positiven Effekt auf die Chondrogenität, sondern wirken erst positiv auf die Differenzierung der Stammzellen, wenn es zu einer Verschlechterung der chondrogenen Situation, wie z.B. durch eine höhere Zellpassage oder wie hier durch den Bioreaktor, kommt.

Bei Patienten die sich klinisch mit Knorpelläsionen vorstellen, zeigen sich häufig suboptimale Bedingungen hinsichtlich der chondrogenen Situation, sodass die Magnetfeldtherapie hier als adjuvante Therapie hilfreich sein könnte.

Für einen klinischen Einsatz der simulierten Mikrogravitation, welche in der Lage war der terminalen Zellhypertrophie entgegenzuwirken, sind weitere Versuche erforderlich um die Suppression der Kollagen Typ II – Synthese zu optimieren. Sollte dies gelingen, so stünde möglicherweise, in Anbetracht der immensen Kosten, die durch Knorpelschäden hervorgerufen werden, ein kostengünstiges Verfahren zur Verfügung

## 5. Tabellenverzeichnis

Tab.Nr.	Erläuterung	Seite	Quelle
Tab. 1	Übersicht der verschiedenen Kollagen Typen, die im Knorpel gefunden werden können, mit ihrer Lokalisation und Funktion	3	Bhosale et al. (2008)
Tab. 2	Verwendete Parameter für die Magnetfeld-Stimulation	31	Selbst erstellt
Tab. 3	Protokoll zur cDNA-Synthese	44	Selbst erstellt
Tab. 4	Zusammensetzung des Master-Mix	44	Selbst erstellt
Tab. 5	Verwendete Einstellungen für das PCR-Programm beim Nachweis von Kollagen II und Aggrekan	46	Selbst erstellt
Tab. 6	Verwendete Einstellungen für das PCR-Programm beim Nachweis von Kollagen X	46	Selbst erstellt
Tab. 7	Verwendete Einstellungen für das PCR-Programm beim Nachweis von SOX-9 und GAPDH	46	Selbst erstellt
Tab. 8	Zusammensetzung des Hybridisierungscocktails der Microarrayanalyse	49	Selbst erstellt
Tab. 9	Ergebnisse für GAPDH aus der PCR-Analyse im Vorversuch mit Chondrozyten	54	Selbst erstellt
Tab. 10	Ergebnisse für Aggrekan aus der PCR-Analyse im Vorversuch und der daraus gebildete Aggrekan/GAPDH-Quotient mit Chondrozyten	54	Selbst erstellt
Tab. 11	Übersicht der verschiedenen Gruppen und der jeweiligen verwendeten Stimuli	55	Selbst erstellt
Tab. 12	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 1 im Hauptversuch	61	Selbst erstellt

---

Tab. 13	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 2 im Hauptversuch	61	Selbst erstellt
Tab. 14	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 3 im Hauptversuch	62	Selbst erstellt
Tab. 15	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 4 im Hauptversuch	62	Selbst erstellt
Tab. 16	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 5 im Hauptversuch	62	Selbst erstellt
Tab. 17	Übersicht der PCR-Ergebnisse für die Marker GAPDH, Kollagen II, Aggrekan, Kollagen X und SOX-9 für Gruppe 6 im Hauptversuch	63	Selbst erstellt
Tab. 18	Übersicht des Kollagen II / Kollagen X Quotienten der Gruppen 3 bis 6	68	Selbst erstellt
Tab. 19	Zusammenfassende Übersicht der PCR Ergebnisse, geordnet nach Gruppe und Marker.	71	Selbst erstellt



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb.Nr.	Erläuterung	Seite	Quelle
Abb. 1	Histologischer Aufbau des hyalinen Knorpels	2	Kellgren& Lawrence (2013)
Abb. 2	Aufbau des hyalinen Knorpels ausgehend von einem Chondrozyten mit Kollagen II-Fasern, Aggrecan und Hyaluronsäure	4	Chen et al. (2006) *modifiziert
Abb. 3	Darstellung der häufigsten Arthroselokalisationen	5	Arthrose-Hilfe e.V.
Abb. 4	Übersicht der verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten (Fett, Knochen, Sehne, Muskel, Knorpel, Knochenmark) der HMSCs	8	Caplan et al. (2007)
Abb. 5	Ablauf der Chondrogenese mit Darstellung beteiligter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sowie typischerweise exprimierter Proteine in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums	10	Goldring et al. (2006)
Abb. 6	Darstellung des SOX-9 Pathways im Rahmen der chondrogenen Differenzierung während der enchondralen Ossifikation	11	Akiyama et al. (2002)
Abb. 7	Übersicht der verschiedenen Frequenzbereiche der elektromagnetischen Wellen mit ihrer entsprechenden Wellenlänge und der dabei vorliegenden Eigenschaft bzw. Verwendung	13	<a href="http://physwiki.ucdaucd.com">http://physwiki.ucdaucd.com</a> modifiziert
Abb. 8	Darstellung der Kopplung von elektrischen und magnetischen Feldern	14	<a href="http://www.chemgapedia.de">www.chemgapedia.de</a>
Abb. 9	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	17	selbst erstellt

Abb. 10	Darstellung einer Neubauer-Zählkammer mit vitalen(weiß) und avitalen Zellen(blau) HMSCs unter Trypanblaufärbung im Mikroskop	28	www.Wikipedia.de modifiziert
Abb. 11	Vergleich der verschiedenen Magnetfeld-anordnungen: a) zirkuläre Anordnung in einer sogenannten Solenoidspule b) Zwei parallel Gelegene Magnetspulen in einer sogenannten Helmholtz-Anordnung	30/31	a) Selbst erstellt b) Von der „Neuen Magnetodyn GmbH“ zur Verfügung gestellt
Abb. 12	Temperaturkurve aufgezeichnet über etwa 40 Stunden bei einer Temperatur von $37 \pm 0,25^\circ \text{C}$	32	Selbst erstellt/LabView
Abb. 13	Darstellung des kommerziellen RCCS von Synthecon Inc.	33	Synthecon Inc.
Abb. 14	Darstellung eines Pellets in einem Bioreaktorgefäß und schematische Einzeichnung der Rotationsbewegung entgegen der Schwerkraft	34	Selbst erstellt
Abb. 15	Darstellung eines Pellets in einem Bioreaktorgefäßes zur Verdeutlichung der Corioliskraft	35	Selbst erstellt
Abb. 16	Aufnahme eine Bioreaktorgefäßes von vorne und hinten	36	Selbst erstellt
Abb. 17	Übersicht des Versuchsaufbau mit Darstellung der einzelnen Komponenten	37	Selbst erstellt
Abb. 18	Illustration der Einzelschritte der immunhistologischen Anfärbung von Kollagen II	42	Selbst erstellt
Abb. 19	Darstellung der cDNA Synthese mit dem NuGen-Kit für die Microarray-Analyse	48	NuGen-Kit Anleitung

Abb. 20	Vergleich eines Pellets aus einem a) Multipellet-Vorversuches(mehr als 1 Pellet im Bioreaktor) mit deutlicher Verformung b) Einzelpellet-Vorversuches (1 Pellet im Bioreaktor) ohne deutliche Entrundung des Pellets	52	Selbst erstellt
Abb. 21	Übersicht der mRNA-Expression von Aggrekan im Rahmen der Vorversuche mit Chondrozyten	54	Selbst erstellt
Abb. 22	Übersicht der angeschnittenen histologischen Präparate geordnet nach Gruppe und Färbung in 10-facher Vergrößerung	56	Selbst erstellt
Abb. 23	Ausschnitte der Pellets aus den Gruppen 3-6 in der Safranin-O-Fast-Green Färbung in 20-facher Vergrößerung	57	Selbst erstellt
Abb. 24	Ausschnitte der Pellets aus den Gruppen 3-6 in der Alzianblau-Färbung in 20-facher Vergrößerung	58	Selbst erstellt
Abb. 25	Ausschnitte der Pellets aus den Gruppen 3-6 in der Toluidinblau-Färbung in 20-facher Vergrößerung	59	Selbst erstellt
Abb. 26	Ausschnitte der Pellets aus den Gruppen 3-6 in der immunhistologischen Anfärbung von Kollagen II in 20-facher Vergrößerung	60	Selbst erstellt
Abb. 27	Diagramm zur Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen II unterteilt nach Stimulationsfaktoren	64	Selbst erstellt
Abb. 28	Diagramm zur Darstellung der mRNA-Expression von Aggrekan unterteilt nach Stimulationsfaktoren	65	Selbst erstellt
Abb. 29	Diagramm zur Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen X unterteilt nach Stimulationsfaktoren	66	Selbst erstellt

---

Abb. 30	Diagramm zur Darstellung der mRNA-Expression von SOX-9 unterteilt nach Stimulationsfaktoren	67	Selbst erstellt
Abb. 31	Diagramm zur Darstellung des Quotienten der Kollagen II /Kollagen X mRNA-Expression unterteilt nach Stimulationsfaktoren	68	Selbst erstellt
Abb. 32	Übersicht der Resultate der Bioanalyser-Untersuchung geordnet nach Versuchsgruppen	69	Selbst erstellt
Abb. 33	Ergebnis der Microarrayuntersuchung(Heatmap)	70	Selbst erstellt

---

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Afanasyev Boris V., E.E.E., Zander Axel R., *A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept*. Cellular Therapy and Transplantation, 2009. **1**(3): p. 31-37.
2. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
3. Bassett, C., *Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs)*. Crit Rev Biomed Eng, 1989. **17**(5): p. 451-529.
4. Bell, D.M., et al., *SOX9 directly regulates the type-II collagen gene*. Nat Genet, 1997. **16**(2): p. 174-8.
5. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. Br Med Bull, 2008. **87**: p. 77-95.
6. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B, *Sox9 is required for cartilage formation*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 85-89.
7. Bijlsma, J.W., F. Berenbaum, and F.P. Lafeber, *Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2115-26.
8. Blaber, E., et al., *The Influence of Microgravity on Astronaut Health: Global Study of Microgravity Effects on Human Stem Cells*. LPI Contributions, 2010. **1538**: p. 5201.
9. Bobacz, K., et al., *Effect of pulsed electromagnetic fields on proteoglycan biosynthesis of articular cartilage is age dependent*. Annals of the rheumatic diseases, 2006. **65**(7): p. 949-951.
10. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
11. Bruns, J. and J. Steinhagen, *Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität– Biologische Grundlagen*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2000. **51**(2): p. 42-47.
12. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 341-7.
13. Carmeliet, G. and R. Bouillon, *The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts in vitro*. The FASEB journal, 1999. **13**(9001): p. S129-S134.
14. Chan, F.K., et al., *Celecoxib versus diclofenac and omeprazole in reducing the risk of recurrent ulcer bleeding in patients with arthritis*. N Engl J Med, 2002. **347**(26): p. 2104-10.
15. Chang, W., et al., *Expression and Signal Transduction of Calcium-Sensing Receptors in Cartilage and Bone 1*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5883-5893.

- 
16. de Pomerai, D., et al., *Cell biology: Non-thermal heat-shock response to microwaves*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 417-418.
17. Deborah McK. Ciombor, G.L., Roy K. Aaron , Peter Neame , Bruce Caterson, *Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins*. Journal of Orthopaedic Research, 2002. **20**: p. 40-50.
18. Dharmasaroja, P., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(1): p. 12-20.
19. Duchow J. , K.D., *Die Behandlung der beginnenden Gonarthrose im mittleren Lebensalter*. Der Orthopäde, 2003. **32**(10): p. 920-929.
20. Duke, J., et al., *Clinorotation inhibits chondrogenesis in micromass cultures of embryonic mouse limb cells*. Environmental medicine: annual report of the Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, 1995. **39**(1): p. 1-12.
21. Fan, H., et al., *Gelatin microspheres containing TGF-beta3 enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells in modified pellet culture*. Biomacromolecules, 2008. **9**(3): p. 927-34.
22. Faye, J., *Copenhagen Interpretation of Quantum Mechanis*. The Stanford Encyclopedia of Philosophy, 2008.
23. Felicia Ng, S.B., Susie Koh, Konduru S. R. Sastry, Lucas Chase, Uma Lakshmipathy, Cleo Choong, Zheng Yang, Mohan C. Vemuri, Mahendra S. Rao, and Vivek Tanavde, *PDGF, TGF- , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages*. BLOOD, 2008. **112**(2): p. 295-307.
24. Felson, D.T., *Developments in the clinical understanding of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(1): p. 203.
25. Felson, D.T., et al., *Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study*. Ann Intern Med, 1992. **116**(7): p. 535-9.
26. Fitzsimmons, R., et al., *Combined magnetic fields increased net calcium flux in bone cells*. Calcified tissue international, 1994. **55**(5): p. 376-380.
27. Freed, L.E., et al., *Tissue engineering of cartilage in space*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(25): p. 13885-13890.
28. Fukada, E. and I. Yasuda, *On the piezoelectric effect of bone*. Journal of the Physical Society of Japan, 1957. **12**(10): p. 1158-1162.
29. G. Beneke, O.E., H. Becker, R. Kulka, *Über Wachstum und Degeneration des Trachealknorpels*. Virchows Arch. path. Anat., 1966. **341**: p. 365-380.
30. Garip, A.I. and Z. Akan, *Effect of ELF-EMF on number of apoptotic cells; correlation with reactive oxygen species and HSP*. Acta Biologica Hungarica, 2010. **61**(2): p. 158-167.

- 
31. Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, *Collagens--structure, function, and biosynthesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1531-46.
32. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2006. **97**(1): p. 33-44.
33. Goodman, R., Blank, M., *Insights Into Electromagnetic Interaction Mechanism*. Journal of Cellular Physiology, 2002. **192**: p. 16-22.
34. Gollwitzer, H., Schauwecker, J., Burgkart, R., Rechl, H., & von Eisenhart-Rothe, R., *Gelenkerhaltende Hüftchirurgie im Erwachsenenalter Intertrochantäre Femurosteotomie*. Der Orthopäde, 2012. **41**(8): p. 677-690.
35. Gordon, G.A., *Designed electromagnetic pulsed therapy: clinical applications*. Journal of cellular physiology, 2007. **212**(3): p. 579-582.
36. Group, I.S., *Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(3): p. 675-94.
37. Guidi, A., et al., *A mechanobiologic research in a microgravity environment bioreactor*. American Institute of Aeronautics and Astronautics, 2002.
38. Ha, M., et al., *Radio-frequency radiation exposure from AM radio transmitters and childhood leukemia and brain cancer*. American journal of epidemiology, 2007. **166**(3): p. 270-279.
39. Hackenbroch, M.H., *[Coxarthrosis]*. Orthopade, 1998. **27**(9): p. 659-67.
40. Hammond, T. and J. Hammond, *Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2001. **281**(1): p. F12-F25.
41. Hendee, S.P., et al., *The effects of weak extremely low frequency magnetic fields on calcium/calmodulin interactions*. Biophysical journal, 1996. **70**(6): p. 2915.
42. Indouraine, A., J. Petersen, and W. Pförringer, *[Effects of low-frequency pulsed electromagnetic fields on the proliferation of chondrocytes]*. Sportverletzung Sportschaden: Organ der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin, 2001. **15**(1): p. 22-27.
43. Ingelmark, B.E. and J. Sääf, *Über Die Ernährung Des Gelenkknorpels Und Die Bildung Der Gelenkflüssigkeit Unter Verschiedenen Funktionellen Verhältnissen*. Acta Orthopaedica, 1948. **17**(1-4): p. 303-357.
44. Ingram, M., et al., *Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1997. **33**(6): p. 459-466.
45. RKI., *Gesundheitsberichterstattung des Bundes Gesundheit in Deutschland*. 2006: p. 34-39.

- 
46. RKI., *Lebensphasenspezifische Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland Ergebnisse des Nationalen Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS)*. 2008: p. 47.
47. Ivancsits, S., et al., *Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2002. **519**(1): p. 1-13.
48. J. Grifka, S.A., J. Löhnert, R. Baag, S.Feldt, *Regeneration von Gelenkknorpel durch die autologe Chondrozytentransplantation*. Arthroskopie, 2000. **13**: p. 113-122.
49. Jackson, J., *Klassische Elektrodynamik*. 2006, Berlin: De Gruyter.
50. Joyce, M.E., S. Jinguishi, and M. Bolander, *Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair*. The Orthopedic clinics of North America, 1990. **21**(1): p. 199-209.
51. K.P. Günther, W.P., H. Brenner, T. Stürmer, *Klinische Epidemiologie von Hüft- und Kniegelenkarthrosen: Eine Übersicht über Ergebnisse der "Ulmer Osteoarthritis Studie"*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2002. **64**: p. 244-249.
52. Kassem, M. and B.M. Abdallah, *Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 157-63.
53. Kassis, I., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(10): p. 967-76.
54. Klaus, D.M., *Clinostats and bioreactors*. Gravitational and Space Research, 2007. **14**(2).
55. Koh, Y.G., et al., *Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis*. Arthroscopy, 2013. **29**(4): p. 748-55.
56. Komori, T., *Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 189-95.
57. Kumei, Y., et al., *Inhibition of HSP70 and a Collagen-Specific Molecular Chaperone (HSP47) Expression in Rat Osteoblasts by Microgravity*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **1010**(1): p. 476-480.
58. Lednev, V., *Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems*. Bioelectromagnetics, 1991. **12**(2): p. 71-75.
59. Lee, P.H. and H.J. Park, *Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a candidate disease-modifying strategy in Parkinson's disease and multiple system atrophy*. J Clin Neurol, 2009. **5**(1): p. 1-10.
60. Lin, J., et al., *Efficacy of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis: meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ, 2004. **329**(7461): p. 324.



61. Loesberg, W., et al., *Simulated microgravity activates MAPK pathways in fibroblasts cultured on microgrooved surface topography*. Cell motility and the cytoskeleton, 2008. **65**(2): p. 116-129.
62. Mackay, A.M., et al., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. **4**(4): p. 415-28.
63. Masuda, H., N. Hosokawa, and K. Nagata, *Expression and localization of collagen-binding stress protein Hsp47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen*. Cell stress & chaperones, 1998. **3**(4): p. 256.
64. Matta, C., et al., *Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: A possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells*. Cell Calcium, 2008. **44**(3): p. 310-323.
65. Maxwell, J.C., *A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1865. **155**: p. 459-512.
66. Mayer, M. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cellular and molecular life sciences, 2005. **62**(6): p. 670-684.
67. Mayer-Wagner, S., et al., *Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(4): p. 283-90.
68. Mayer-Wagner, S., et al., *Membrane-based cultures generate scaffold-free neocartilage in vitro: influence of growth factors*. Tissue Engineering Part A, 2009. **16**(2): p. 513-521.
69. McCann, J., et al., *A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1993. **297**(1): p. 61-95.
70. Michelozzi, P., et al., *Adult and childhood leukemia near a high-power radio station in Rome, Italy*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(12): p. 1096-103.
71. Murphy, J., et al., *Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1993. **296**(3): p. 221-240.
72. Nagata, K., *Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone*. Trends in biochemical sciences, 1996. **21**(1): p. 23-26.
73. Ongaro, A., et al., *Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells*. Bioelectromagnetics, 2014. **35**(6): p. 426-436.
74. P. Diehl, L.G., J. Schauwecker, P.C. Kreuz, H. Gollwitzer, T. Tischer, *Konservative Therapie der Gonarthrose*. Der Orthopäde, 2013. **2**: p. 125-139.
75. Paolo Vecchia, R.M., Gunde Ziegelberger, James Lin, Richard Saunders, Anthony Swerdlow, *Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz)*. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 2009.

- 
76. Park, H.J., et al., *Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease*. J Neurochem, 2008. **107**(1): p. 141-51.
77. Pelttari, K., 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**(10): p. 3254-66.
78. Pezzetti, F., et al., *Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in vitro study*. Calcified tissue international, 1999. **65**(5): p. 396-401.
79. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
80. Poole, C. and D. Trichopoulos, *Extremely low-frequency electric and magnetic fields and cancer*. Cancer Causes & Control, 1991. **2**(4): p. 267-276.
81. Prior, H.M. and M.A. Walter, *SOX genes: architects of development*. Mol Med, 1996. **2**(4): p. 405-12.
82. Protection, I.C.o.N.-I.R., *Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz to 100 kHz)*. Health Physics, 2010. **99**(6): p. 818-836.
83. Puetzer, J.L., J.N. Petite, and E.G. Loba, *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 Engineering Part B: Reviews, 2010. **16**(4): p. 435-444.
84. Rajesh V. Thakker, M.P.W., John Eisman, Takashi Igarashi, *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease, 1st Edition*. 2012: Academic Press.
85. Rudert, M. and C.J. Wirth, *[Cartilage regeneration and substitution]*. Orthopade, 1998. **27**(5): p. W309-21.
86. Sandweiss, J., *On the cyclotron resonance model of ion transport*. Bioelectromagnetics, 1990. **11**(2): p. 203-205.
87. Schmidt-Rohlfing, B., et al., *Effects of pulsed and sinusoid electromagnetic fields on human chondrocytes cultivated in a collagen matrix*. Rheumatology international, 2008. **28**(10): p. 971-977.
88. Schrek, R., *A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions*. The American Journal of Cancer, 1936. **28**(2): p. 389-392.
89. Schüz, J. and A. Ahlbom, *Exposure to electromagnetic fields and the risk of childhood leukaemia: a review*. Radiation protection dosimetry, 2008.
90. Schwarz, R.P., T.J. Goodwin, and D.A. Wolf, *Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity*. Journal of tissue culture methods, 1992. **14**(2): p. 51-57.

- 
91. Shen, G., *The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage*. Orthod Craniofac Res, 2005. **8**(1): p. 11-7.
92. Shen, J.F., et al., *Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues*. Int J Oral Sci, 2011. **3**(3): p. 117-24.
93. Sheyn, D., et al., *The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(11): p. 3403-3412.
94. Shintani, N., K.A. Siebenrock, and E.B. Hunziker, *TGF- $\alpha$ 1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53086.
95. Sibonga, J.D., *Spaceflight-induced bone loss: is there an osteoporosis risk? Current osteoporosis reports*, 2013. **11**(2): p. 92-98.
96. Solchaga, L.A., et al., *FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Journal of cellular physiology, 2005. **203**(2): p. 398-409.
97. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**(6): p. 461-8.
98. Spahn, G., *Knorpelschaden und Gonarthrose*. Akt Traumatol, 2006. **36**: p. 1-13.
99. Stamenković, V., et al., *Neocartilage formation in 1 g, simulated, and microgravity environments: implications for tissue engineering*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(5): p. 1729-1736.
100. Tang, Q.O., et al., *TGF- $\beta$ 3: A potential biological therapy for enhancing chondrogenesis*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(6): p. 689-701.
101. Thorp, B.H., I. Anderson, and S.B. Jakowlew, *Transforming growth factor- $\beta$  1,- $\beta$  2 and- $\beta$  3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick*. Development, 1992. **114**(4): p. 907-911.
102. Tomita, M., et al., *Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(44): p. 42214-42218.
103. Ulbrich, C., et al., *Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2010. **25**(4-5): p. 551-560.
104. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 2 ed. 2005, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.
105. Unfallchirurgie, A.L.d.D.G.f., *S1-Leitlinie Endoprothese bei Gonarthrose*. 2009, DGU & ÖGU.
106. V. Martinek, A.B.I., *Therapie von Knorpelschäden*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2003. **54**(3): p. 70-76.

- 
107. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
108. Varas, L., et al.,  *$\alpha$ 10 Integrin Expression Is Up-Regulated on Fibroblast Growth Factor-2-Treated Mesenchymal Stem Cells with Improved Chondrogenic Differentiation Potential*. Stem cells and development, 2007. **16**(6): p. 965-978.
109. Vogt S, I.A., *Tissue-Engineering am Kniegelenk - was ist gesichert?* Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2007. **4**(58): p. 98-104.
110. von Will Kleber, H.-J.B., Joachim Bohm, Detlef Klimm, *Einführung in die Kristallographie*. 2010.
111. WAHLSTRÖM, O., *Stimulation of fracture healing with electromagnetic fields of extremely low frequency (EMF of ELF)*. Clinical orthopaedics and related research, 1984. **186**: p. 293-301.
112. Wakitani, S., et al., *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76**(4): p. 579-92.
113. Waller, C., et al., *Unload it: the key to the treatment of knee osteoarthritis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**(11): p. 1823-9.
114. Waller, C., et al., *Unload it: the key to the treatment of knee osteoarthritis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**(11): p. 1823-9.
115. Welsch, U., *Sobotta - Lehrbuch Histologie*. 2 ed. 2006, München - Jena: URBAN & Fischer Verlag (Elsevier).
116. WHO, *Electromagnetic fields and public health : Extremely low frequency*. Fact Sheet WHO/205, 1998.
117. Williams, A.R., et al., *Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction*. Circulation, 2013. **127**(2): p. 213-23.
118. Wright, E., et al., *The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos*. Nat Genet, 1995. **9**(1): p. 15-20.
119. Young, T., *The Bakerian Lecture: Experiments and Calculations Relative to Physical Optics*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1804. **94**: p. 1-16.
120. Zhang, L., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems*. Biotechnology letters, 2010. **32**(9): p. 1339-1346.
121. Spahn, G., Klinger, H. M., Mückley, T., & Hofmann, G. O. (2010). *Four-year results from a randomized controlled study of knee chondroplasty with concomitant medial meniscectomy: mechanical debridement versus radiofrequency chondroplasty*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, **26**(9), S73-S80

---

## 8. Danksagung

Eine Dissertation ist nicht das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich nun bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung ermöglicht haben.

So möchte ich mich zuallererst bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Peter E. Müller, für die interessante Themenauswahl und die exzellente Betreuung und Unterstützung, die er mir während dem gesamten Forschungsprojekt gewährte, bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt auch meiner Betreuerin PD Dr. Susanne Mayer, die durch ihre hervorragende und hingebungsvolle Betreuung eine große Hilfe über die gesamte Zeit der Doktorarbeit für mich war. Sie fand immer Zeit um Probleme zu besprechend und gemeinsam zu lösen.

Für die technische Unterstützung und Hilfe bei der Realisation des Versuchsaufbaus möchte ich Herrn Heribert Stephan von der „neuen Magnetodyn GmbH“ einen Dank aussprechen, da er stets für technische Fragen und Vorschläge zu erreichen war. In der Zeit meiner Doktorarbeit wurde ich durch viele Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors unterstützt. Besonders hervorheben möchte ich dabei Frau Bärbel Schmitt, die stets ein Ohr für mich hatte und mich in die Grundlagen der Zellkultur einführte. Auch Julia Redeker möchte ich erwähnen, da sie ebenfalls eine große Hilfe war und ich wünsche ihr auf ihrem Weg der Humanmedizin, den sie vor kurzem eingeschlagen hat, viel Erfolg. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Labors, der Klinik und den anderen Doktorandinnen und Doktoranden für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit sowie die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei der Bayerischen Forschungstiftung und dem FöFoLe-Projekt (Förderung für Forschung und Lehre) der LMU für die Förderung und die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Zu guter Letzt möchte ich mich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter sowie meinen Großeltern für die stetige und liebevolle Unterstützung danken und widme diese Arbeit meinem 2012 verstorbenen Großvater, der meine Entwicklung vom Beginn des Studiums der Humanmedizin bis kurz vor den Abschluss stets mit Stolz verfolgt hatte.



---

2009	Famulatur auf der gastro-enterologischen Station des Klinikum Innenstadt München
2009	Famulatur auf der unfallchirurgischen Station des Klinikum Innenstadt München
2011	Wahlfach Orthopädie am Klinikum Großhadern
2011	Famulatur in einer orthopädischen Arztpraxis
2011	1. Terial des Praktischen Jahres im Bereich der Inneren Medizin im Klinikum Innenstadt München (Kardiologie, Angiologie, Hämato-Onkologie, Nothilfe)
2011-2012	2. Terial des Praktischen Jahres im Bereich der Chirurgie in Großhadern (chirurgische Poliklinik/Nothilfe, Unfallchirurgie, Allgemein Chirurgie)
2012	3. Terial des Praktischen Jahres im Bereich der Orthopädie in Großhadern
2012	Mitgliedschaft in der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA)
2012	Abschluss des Studiums der Humanmedizin (Note:2)
2013	Mitgliedschaft in der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU)
2013-2014	Beginn als Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
2014	Beginn der unfallchirurgischen 2-Jahres-Rotation in der HELIOS-Klinik München-Perlach
2014	Aktives Mitglied im Jungen Forum der DGOU

### **Publikationen**

„Simulated microgravity affects chondrogenesis and hypertrophy of human mesenchymal stem cells“ – International Orthopaedics 2014