

Aus der Abteilung für Unfallchirurgie  
Prof. Dr. med. Michael Nehrlich

Fakultät für Medizin  
Universität Regensburg

Hypertrophie  
chondrogen differenzierender mesenchymaler Stammzellen  
im dreidimensionalen System

**Inaugural – Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Vorgelegt von

Eva Maria Teegen

**2012**



Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Angele

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Anja Bosserhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2013

Die vorliegende Arbeit entstand während der Zeit vom Frühjahr 2008 bis Frühjahr 2012 in der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg.

Angeregt und betreut wurde sie durch

Prof. Dr. med. Peter Angele und Dr. med. Michael Müller.

“ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt“.

Eva Maria Teegen

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>8</b>
<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>16</b>
<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>17</b>
<b>VERSUCHSAUFBAU</b>	<b>17</b>
<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN UND ZELLHERKUNFT</b>	<b>18</b>
ZELLGewinnung	18
PERCOLL-GRADIENTEN-TRENNUNG	18
VITALITÄTSASSAY UND BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL	19
AMPLIFIKATION	19
DIFFERENZIERUNG	20
ZELLKULTURSYSTEME	21
<b>NASSCHEMISCHE ANALYSEVERFAHREN</b>	<b>23</b>
ALKALISCHE PHOSPHATASE-AKTIVITÄT	23
PAPAINVERDAU	23
DNA-BESTIMMUNG	24
GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT	24
<b>HISTOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>25</b>
DIMETHYLMETHYLENBLAU	26
ALKALISCHE PHOSPHATASE	26
<b>IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>26</b>
KOLLAGEN-II UND KOLLAGEN-X	26
<b>STATISTIK</b>	<b>28</b>
<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>29</b>
<b>NASSCHEMISCHE VERFAHREN</b>	<b>29</b>
ZELLZAHL	29
GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT	32
GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT BEZOGEN AUF DNA-GEHALT	35
ALKALISCHE-PHOPHATASE-AKTIVITÄT	38
<b>HISTOLOGIE</b>	<b>42</b>
DIMETHYLMETHYLENBLAU	42
ALKALISCHE PHOSPHATASE	44
<b>IMMUNHISTOLOGIE</b>	<b>46</b>
KOLLAGEN-II	46
KOLLAGEN-X	47
<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>49</b>
<b>HYPERTROPHIEINDUKTION IM MATRIXSYSTEM</b>	<b>49</b>
<b>AUSWIRKUNG VON PTHRP</b>	<b>51</b>

<b>PROBLEME DES MATRIXMODELLS</b>	<b>53</b>
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>65</u></b>
<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>66</u></b>

## EINLEITUNG

Tissue engineering gehört heute zu den gängigen Schlagwörtern der modernen Medizin. Biologisches Gewebe wird *in vitro* gezüchtet, um krankes Gewebe *in vivo* zu ersetzen (5). Besonders wenn das Gewebe nur zu einer beschränkten Selbstheilung fähig ist, bietet sich hier eine vielversprechende Therapieoption. Es ist eine multidisziplinäre Zusammenarbeit, bei der naturwissenschaftliche wie medizinische Kompetenzen gefragt sind. Notwendig für erfolgreiches Tissue engineering sind drei wesentliche Bausteine: erstens geeignete Zellen, zweitens die geeigneten bioaktiven Substanzen, die diese Zelle stimulieren können und letztendlich eine geeignete Matrix zur Unterstützung des Gewebes (54).

Der Gelenkknorpel hat im Laufe der Evolution seine Struktur optimiert, um den auf ihn einwirkenden Kräften und Scherkräften des täglichen Lebens standzuhalten (40, 70). Sowohl das größte wie auch das kleinste Gelenk unseres Körpers gleichen sich im molekularen, zellulären und mechanischen Aufbau trotz komplett unterschiedlicher Funktionen (70). Die morphologische Besonderheit des hyalinen Gelenkknorpels ist der hohe Anteil von 95% an extrazellulärer Matrix. Diese wird von den Chondrozyten produziert und besteht vorwiegend aus Kollagen-II und wird ergänzt durch Kollagen-IV,-IX und XI. Weitere Bestandteile sind die Proteoglycane, die auf Grund des Kollagennetzwerkes nur zu 40% bis 50% hydriert sind. Glykoproteine, Ionen, Proteasen und Hyaluronidasen stellen einen weiteren Part dar. Charakteristisch sind auch das Lysozym, die Matrixmetalloproteasen, Aggrecanasen und die Tissue-inhibitor-metallo-protease (24, 53, 70, 73, 93).

Ein weiteres Charakteristikum ist das Fehlen von Gefäßen und nervaler Innervation. Die Chondrozyten liegen in einer perizellulären Matrix, einer sogenannten Lakune, eingebettet und reagieren auf die Mediatoren und Faktoren ihrer Umgebung. Ernährt wird der Gelenkknorpel durch Diffusion, der Stoffwechsel ist vergleichsweise langsam (65). Der O<sub>2</sub>-Verbrauch wird einerseits durch einen hohen Glucose-Umsatz und andererseits durch eine Energiespeicherung in den Mitochondrien gewährleistet. Kommt es zu einem erhöhten Bedarf, reagiert der Gelenkknorpel mit einer Umdifferenzierung reifer Chondrozyten in chondrogene Vorstufen bis zur Dedifferenzierung. Dies kann irreversibel sein und so zu einem Schaden der

Gelenkoberfläche beitragen (70). Bewiesen ist, dass der Knorpelstoffwechsel von der Belastung abhängt (38).

Die Langsamkeit des chondrogenen Metabolismus führt zudem zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit bei chondralen und osteochondralen Defekten (40). Ursachen der Knorpelschädigung können vielfältig und multifaktoriell sein. Hierbei eine große Rolle spielt sicherlich das akute Trauma, gefolgt von Infektionen, Stoffwechselstörungen, statischer Fehlbelastung und genetischen Determinationen (24, 40). Alter, weibliches Geschlecht und vermehrte mechanische Belastung können ebenfalls die Entstehung sowie den Verlauf der Schädigung beeinflussen (16, 24). Über die Norm erhöhte Beanspruchung der Gelenke, wie sie beispielsweise bei Leistungssportlern oder bestimmten Berufsgruppen zu finden ist, korreliert mit der Entstehung von Osteoarthritis, wie in Studien gezeigt werden konnte (10, 12, 16, 56, 86, 90, 99).

Je nach Ausmaß des Defektes ist der Gelenkknorpel begrenzt zur Selbstheilung fähig. Die extrazelluläre Matrix kann in begrenztem Umfang von den Chondrozyten gebildet und das Gewebe bei kleinen, makroskopisch nicht sichtbaren Defekten auf diese Weise ersetzt werden (11, 70). Ist die Gelenkoberfläche jedoch sichtbar geschädigt oder subchondrales Gewebe mitbetroffen, reicht die Regenerationsfähigkeit des Knorpels nicht mehr aus. Zwar wird durch die Verletzung des Gewebes Zellwachstum stimuliert, jedoch erreicht das neugebildete Gewebe nicht die Eigenschaften eines hyalinen Gelenkknorpels, sondern weist im Gegenteil vielmehr die Struktur von Faserknorpel bzw. Zeichen der Hypertrophie und Mineralisierung auf. Demzufolge hängt die Größe des Gewebeschadens mit dem Risiko der Entstehung einer Präarthrose zusammen. Während sich noch kleinste oberflächliche Schäden regenerieren, ist das Potential zur Selbstheilung bei ausgedehnteren Gewebsverletzungen schnell erschöpft und das Stadium einer Präarthrose oder Arthrose erreicht (11).

Die Schäden bleiben fortan lebenslang bestehen und verursachen das weit verbreitete Syndrom der Arthrose (16, 70, 111). Die wesentlichen Symptome sind Schmerz, Bewegungseinschränkung und im fortgeschrittenen Stadium Gelenkkontrakturen, Muskelatrophie und Deformitäten (14, 16, 18).

Knorpeldegeneration als Ursache der Osteoarthritis ist ein Prozess, der sowohl die progrediente Abnahme von Gelenkknorpel wie auch die damit verbundenen Umbauprozesse und die subchondrale Sklerose umfasst (14, 15, 16). Wird die Diagnose gestellt, bedeutet dies eine schlechte Prognose und der Patient wird für sein restliches Leben mit den Symptomen konfrontiert (16).

Heutzutage wird den meisten symptomatischen Patienten mit ausgedehntem Knorpelleiden im Stadium der Arthrose auf Grund der schlechten Heilungschancen eine operative Therapie empfohlen. Bei lokalisierteren Gelenkdefekten dagegen können mittlerweile verschiedenste Therapieoptionen in Betracht gezogen werden, die teilweise bereits in der Klinik Anwendung finden. Zum Beispiel bieten sich stimulierende Verfahren wie die Pridie-Bohrung oder Mikrofrakturierung an. Bei diesen arthroskopischen Verfahren legt der Operateur subchondrales Gewebe unter der Gelenkfläche frei. Hierdurch können Stammzellen in das verletzte Gebiet einwandern und es kommt zur Gewebeneubildung. Die Morphologie dieses neuen Gewebes entspricht jedoch eher der Struktur von Faserknorpel und ist somit dem ursprünglichen Gelenkknorpel in seinen biomechanischen Eigenschaften unterlegen. Von der Technik profitieren zudem meist nur jüngere, nicht übergewichtige Patienten unter dem vierzigsten Lebensjahr mit kleinen umschriebenen Defekten. In Studien konnte gezeigt werden, dass über die Hälfte der behandelten Patienten Beschwerdelinderung angaben, jedoch fehlen oft die Langzeitergebnisse und es gibt Hinweise, dass mit der Zeit das neugebildete Gewebe wieder abnimmt. Aus diesem Grunde handelt es sich lediglich um palliative und nicht kurative Verfahren (11, 49, 57, 69, 89, 100).

Ferner besteht die Idee, durch lokale Applikation von Wachstumsfaktoren Proliferation, Migration, Differenzierung und Matrixsynthese zu fördern. Die Gruppen der FGFs, IGFs und TGF- $\beta$ s nehmen Einfluss auf den chondrogenen Metabolismus und die Chondrogenese (13). Eine direkte Behandlung des Defektes kann so zu einer Stimulation der Heilung des Gelenkknorpels führen (11, 13). Jedoch ist bewiesen, dass die direkte Injektion solcher Faktoren risikobehaftet ist, und unter anderem mit Gelenkentzündung, Osteophytenneubildung und Knorpeldestruktion einhergeht (31, 108). Bleibt die Option, die Wachstumsfaktoren mit Hilfe einer unterstützenden Matrix in das Gelenk einzubringen. In experimentellen Studien

wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$  die Migration von Zellen aus dem Synovium fördert, diese zur Synthese von extrazellulärer Matrix und Heilung durch Gewebeneubildung anregt. Dies wurde beispielsweise in Kniegelenken von Schweinen versucht, in denen scharf umschriebene Defekte mit einer Fibrinmatrix gefüllt wurden, die mit einem chemotaktischen/mitogenen und einem chondrogenen Faktor (u. A. TGF- $\beta$ ) beladen war. In diese Matrix spross mit der Zeit Gewebe ein. Nach 12 Monaten waren bei 54% mehr als 75% dieses Gewebes so transformiert, dass typische chondrogene Marker nachgewiesen werden konnten. Jedoch handelte es sich eher um narbenähnliches Gewebe, das Kollagen-I positiv war und einen geringeren Anteil an Proteoglykanen aufwies als hyaliner Knorpel (13, 43, 44). Bisher ließ sich für die therapeutische Verwendung kein praktikables Schema entwickeln, da sowohl die Interaktion der Faktoren untereinander noch nicht ausreichend erforscht ist, als auch die Zellen älterer Patienten schlechter auf solche Signale ansprechen (19, 69).

Bei der osteochondralen Transplantation wird ein Autograft von einer wenig belasteten Gelenkstelle, beispielsweise der Patella, den Femurkondylen oder der proximalen Fibula, als Gewebezylinder entnommen und an der betroffenen Stelle reimplantiert. Gleichsam können Allografts verwendet werden. Studien zu beiden Optionen liefern akzeptable Ergebnisse, allerdings können mit diesen Methoden lediglich kleine umschriebene Defekte therapiert werden und die Ressourcen an geeignetem Transplantatmaterial sind limitiert. Zudem ist der Nachteil der Donormorbidität gegeben, da gesundes Gewebe verletzt wird (4, 7, 11, 20, 25, 33, 35, 79, 89, 91).

Schließlich bleibt die Transplantation von Zellen, die autologe wie auch die autologe matrixgestützte Chondrozytentransplantation. Bei Ersterer werden Chondrozyten aus einer gesunden Stelle entnommen und 2 bis 5 Wochen kultiviert (11). Die betroffene Stelle wird in einer weiteren Operation mit einem Periostlappen abgedeckt und die vorkultivierten Zellen unter diesen injiziert (9). Die klinischen Symptome können so abgemildert werden und es kommt zur Bildung von hyalinem Knorpel. Allerdings wurde im Tierversuch gezeigt, dass sich dieser bereits nach 3 Monaten wieder zurückbildet (89).

Die matrixgestützte autologe Chondrozytentransplantation dagegen erzielt wesentlich bessere Ergebnisse. Aus diesem Grunde findet das Verfahren, bei dem eine künstliche Matrix mit den Chondrozyten beimpft und dieses Konstrukt implantiert wird, heute klinische Anwendung (89). Nachteilig bleibt die Notwendigkeit zweier operativer Eingriffe und das zusätzliche Verletzen gesunden Knorpelgewebes (Donormorbidität). Zudem de-differenzieren Chondrozyten während der Zellkultur (5). Der gleiche Prozess wird bei den in die Matrix injizierten Zellen beobachtet (8, 39, 40, 106).

Bleibt zusammenzufassen, dass sich zwar für kleine umschriebene Knorpeldefekte bereits Therapieoptionen anbieten, diese jedoch oft mit Nachteilen wie der Donormorbidität einhergehen. Dies rechtfertigt die aktuelle Forschung und Bemühungen, die Methoden des Tissue engineering für eine weitere Heilungschance zu nutzen. Kann man aus einer zellulären Vorstufe, einer Zellspezies, die vergleichsweise einfach zu gewinnen ist, hyalines Knorpelgewebe *in vitro* züchten, um es in den Defekt zu implantieren, würde man diesen wesentlichen Nachteil beispielsweise umgehen.

Um auf die oben genannten drei Bausteine des Tissue Engineering zurückzukommen, fiel für den ersten Baustein – die Zellkomponente – im folgenden Projekt die Wahl auf adulte mesenchymale Stammzellen. Man findet sie unter Anderem im Knochenmark, Fettgewebe und Synovium (21, 118). Die Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen ist vergleichsweise einfach, da die Entnahme gering invasiv und unkompliziert aus dem Beckenkamm erfolgen kann. Studien haben gezeigt, dass sie multipotent sind und unter Anderem die Fähigkeit besitzen, zu transientem Knorpel zu differenzieren. Transiente Knorpelzellen finden sich physiologisch in der Wachstumsfuge, um während der enchondralen Ossifikation einen sequentiellen Differenzierungsprozess zu durchlaufen (1, 6, 46). Zu Beginn des Knochenwachstums kondensieren mesenchymale Progenitorzellen und es kommt zur Induktion der Chondrogenese, wodurch der transiente Knorpel gebildet wird. Im weiteren Verlauf hypertrophieren die Chondrozyten, die Zellorganellen schwellen an, die Zellgröße nimmt zu und es werden hypertrophe Marker exprimiert. Hierzu zählen Kollagen-X, MMP-13, VEGF sowie eine gesteigerte Alkalische-Phosphatase-Aktivität und die Hochregulierung des PTHrP-Rezeptors (3, 51, 72, 75,

76, 84, 85, 103, 116). Im weiteren Verlauf mineralisiert das Gewebe, Gefäße sprossen und Osteoprogenitorzellen wandern ein, bevor die Knorpelzellen schließlich apoptotisch enden und das Gewebe zu Knochengewebe umgebaut wird. Ein physiologischer Vorgang im Rahmen der Ossifikation der Wachstumsfuge (1, 6, 37, 46, 85, 98). Ähnliche pathophysiologische Entwicklungen treten während der Frakturheilung oder Osteophytenbildung auf und wahrscheinlich auch im Rahmen der Arthroseentstehung (36, 47).

Dem gegenüber steht das stationäre Knorpelgewebe, zu dem man Gelenkknorpel, Trachealknorpel und alle anderen kleineren Knorpelstruktur des menschlichen Organismus zählt (46). Im permanenten Knorpel verhindern bisher nicht eindeutig geklärte Mechanismen die enchondrale Ossifikation, den oben beschriebenen Ablauf der Proliferation, Hypertrophie und Apoptose. So entsteht ein stabiler Phänotyp, der in einem postmitotischen Stadium verharrt und durch seine gesamten Struktureigenschaften die biomechanischer Beweglichkeit und Elastizität ermöglicht (36, 46, 47).

Die Methoden des Tissue engineering greifen diese Fähigkeiten des Knorpels auf. Mesenchymale Stammzellen lassen sich *in vitro* sowohl proliferieren als auch zu reifen Chondrozyten differenzieren, wie zahlreiche Experimente zeigten (11, 50, 89, 93, 102, 112, 116). *In vitro* wurde erfolgreich die Expression der knorpelspezifischen Marker Kollagen-II und Aggrecan bewiesen. Allerdings traten ebenfalls das für Faserknorpel spezifische Kollagen-I und die oben aufgeführten charakteristischen Hypertrophiezeichen auf. Mesenchymale Stammzellen, die in Pelletkulturen über einen Zeitraum von 3 bis 7 Wochen chondrogen vordifferenziert und anschließend subkutan in SCID-Mäuse implantiert wurden, wiesen nach 4 Wochen *in vivo* Zeichen der Hypertrophie, Vaskularisierung und Mineralisierung auf (85). Dies ist insbesondere abhängig von der *in-vitro*-Kulturdauer. Je kürzer die Zellen *in vitro* unter chondrogenen Kulturbedingungen vordifferenziert wurden, desto weniger stabil erschien der chondrogene Phänotyp nach der subkutanen Implantation in Mäuse im *in-vivo*-Experiment (28, 58, 85). Ähnliches zeigte ein *in-vivo*-Versuch, währenddessen mesenchymale Stammzellen über 3 Wochen chondrogen vordifferenziert und anschließend subkutan in Nacktmäuse implantiert wurden. Nach 15 bis 40 Tagen *in vivo* beobachtete man eine vermehrte Neoangiogenese und

Zelltod, der Versuch Knorpel- oder Knochengewebe in den Implantaten histologisch nachzuweisen war nicht erfolgreich (27).

Die Herausforderung ist, die Kulturbedingungen zu optimieren, um einen möglichst stabilen chondrogenen Phänotyp zu erhalten und gleichzeitig die Erkenntnisse über die Hypertrophie zu erweitern bzw. mögliche Strategien der Inhibition zu entwickeln. Eine Möglichkeit bietet die Auswahl und Modifikation der bioaktiven Substanzen des Kulturmediums – dem zweiten Baustein des Tissue Engineering.

Die Chondrogenese von adulten mesenchymalen Stammzellen *in vitro* wird durch verschiedene bioaktive Substanzen im Zellmedium induziert, unter Anderem durch Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Dexamethason. TGF- $\beta$  bewirkt die Differenzierung eines chondrozytenähnlichen Phänotyps, der Kollagen-II und -X, Aggrecan, Vesican, Biglykan und Decorin exprimiert (50, 72). Dexamethason spielt bei vielen Reifungsprozessen des menschlichen Körpers eine entscheidende Rolle. Es scheint jedoch ebenfalls die Chondrogenese zu stimulieren und kann die Wirkung von TGF- $\beta$  zusätzlich potenzieren (30, 53).

*In Vitro* zeigte sich im Aggregatsystem durch das Weglassen dieser beider Faktoren (TGF- $\beta$  und Dexamethason) sowie der gleichzeitigen Zugabe von Trijodthyronin (T3) zum Kulturmedium eine Hypertrophieinduktion (67, 70, 78). Trijodthyronin induziert bei embryonalen chondrogenen Progenitorzellen und im transienten Knorpel der Wachstumsfuge unter physiologischen Bedingungen Hypertrophie und somit die Expression hypertrophiespezifischer Marker (67, 71, 78, 87). Dieses Phänomen, nämlich die Expression von Kollagen-X, Alkalische Phosphatase, MMP-13, VEGF und PTHrP-Rezeptor wurde auch bei der *in vitro* Chondrogenese von adulten mesenchymalen Stammzellen beobachtet. Dies lässt schlussfolgern, dass die *in vitro* Chondrogenese von adulten mesenchymalen Stammzellen der enchondralen Osteogenese in der Embryonalphase ähnelt (50, 71, 75, 85, 96, 116).

In der Wachstumsfuge und der embryonalen enchondralen Osteogenese beeinflusst PTHrP die Hypertrophieausbildung. Es wird im fetalen Knorpel sezerniert und von periartikulären Chondrozyten an den Knochenenden. Physiologisch erhält das PTHrP während der Fetalzeit den Pool der proliferierenden Chondrozyten, indem es Chondrozyten über den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1 zur Proliferation stimuliert und

die Produktion des Indian Hedgehog (Ihh), ein weiterer wichtiger parakriner Faktor für das Knochenwachstum, unterdrückt. Sinkt die PTHrP-Konzentration ab, stellen die Chondrozyten die Proliferation ein, differenzieren stattdessen in vermehrtem Maße, prähypertrophieren und produzieren nun Ihh. Ihh stimuliert direkt über einen Rezeptorkomplex Smoothed (Smo) und Patched 1 (Ptch) die Nachbarchondrozyten zur Proliferation und hemmt deren weitere Differenzierung. Gleichzeitig regt es über einen noch nicht geklärten Rückkopplungsprozess die periartikulären Chondrozyten zur Sekretion von PTHrP an (53, 62, 92, 101, 109, 113, 114). Weiterhin steuert es die Umwandlung von perichondralen Zellen zu Osteoblasten am Knochenrand und den Abstand zum Knochenende, in welchem die Chondrozyten aufhören zu proliferieren und hypertrophieren. Die Interaktion von Ihh und PTHrP und der zugehörige Rückkopplungsprozess legen die individuelle Knochenlänge fest (53, 92, 114). Zudem spielt eine verminderte PTHrP-Konzentration bei der Induktion der Hypertrophie eine Rolle. Sein zugehöriger Rezeptor – er kommt bei proliferierenden Chondrozyten in einer sehr geringen Rate vor – wird bei prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten hochreguliert (53). Laboreigene Vorversuche haben ergeben, dass PTHrP die Chondrogenese bis zu einer Konzentration von 100 pM im Medium nicht signifikant hemmt, jedoch einen positiven Einfluss auf den Phänotyp hatte, indem die Alkalische-Phosphatase-Aktivität dosisabhängig gehemmt wurde (72).

Schließlich, um auf den dritten Baustein einzugehen, wurde als Kultursystem eine dreidimensionale Hyaluronan-Gelatine-Composite-Matrix gewählt, die im eigenen Labor hergestellt wird. Scaffolds dienen als Hilfsmittel zum Einbringen von Zellen und auch Wachstumsfaktoren, sie dienen zudem der Stabilität (11) und möglicherweise haben sie einen positiven Effekt auf die Bildung von Zell-Zell-Kontakten oder stimulieren die Bildung von extrazellulärer Matrix (80). Zell-Zell-Kontakte und Zell-Adhäsionsmoleküle bewirken über die Interaktion zwischen den einzelnen Zellen und zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix eine Steuerung bestimmter intrazellulärer Reaktionswege und somit die Expression bestimmter Gene. Beispielsweise beeinflussen N-Cadherin und N-CAM positiv die Kondensationsphase und Chondrogenese mesenchymaler Progenitorzellen in der Wachstumsfuge (29, 107). Es stehen prinzipiell verschiedene Biomaterialien zur Verfügung, natürliche wie

synthetische, aus Knorpel- bzw. Knochengewebe, Kollagen, auch in Kombination mit Hyaluron, Firbinogen, Carbon, Hydroxylapatit und vielen weiteren (13, 14). Prinzipiell arbeitet man im Matrixsystem mit einer geringeren Zelldichte als beispielsweise im Pellet. Dies und der eventuelle Einfluss, den die Matrix auf den Differenzierungsvorgang nimmt, müssen noch näher betrachtet werden.

#### ZIELSETZUNG

Ziel im Versuch sollte einerseits sein, in einer dreidimensionalen Matrix stabile Chondrozyten vom hyalinen Phänotyp aus mesenchymalen Stammzellen zu kultivieren. Ferner sollte die Frage untersucht werden, ob sich in der Matrix ebenfalls ein hypertropher Phänotyp ausbilden lässt und wie PTHrP hierauf Einfluss nehmen kann.

## MATERIAL UND METHODEN

### VERSUCHSAUFBAU

Der Versuchsaufbau gliedert sich in eine Kontrollgruppe und eine PTHrP-Vergleichsgruppe. Die Medien unterschieden sich lediglich durch die Zugabe von PTHrP in einer Konzentration von 100 pM, die aus vorangegangenen laboreigenen Vorversuchen ermittelt wurde.

Die gesamte Kultur dauerte 28 Tage. Innerhalb der ersten zwei Wochen sollte durch die Zugabe von Dexamethason und TGF- $\beta$  die Chondrogenese induziert werden. Am Tag 14 wurde jeweils der Hälfte der Konstrukte diese Faktoren entzogen und stattdessen T3 zum Medium zugesetzt, um einen hypertrophen Phänotyp zu kultivieren. Parallel lief eine entsprechend aufgeteilte Pelletkultur der gleichen Spenderzellen, um deren Güte zu überprüfen und gegebenenfalls Unterschiede zum Matrixsystem aufzuzeigen (Abb. 1). Die Spender waren allesamt männlich, deren Zellen auf Grund der benötigten Anzahl mit Hilfe der Zellkultur proliferiert wurden.

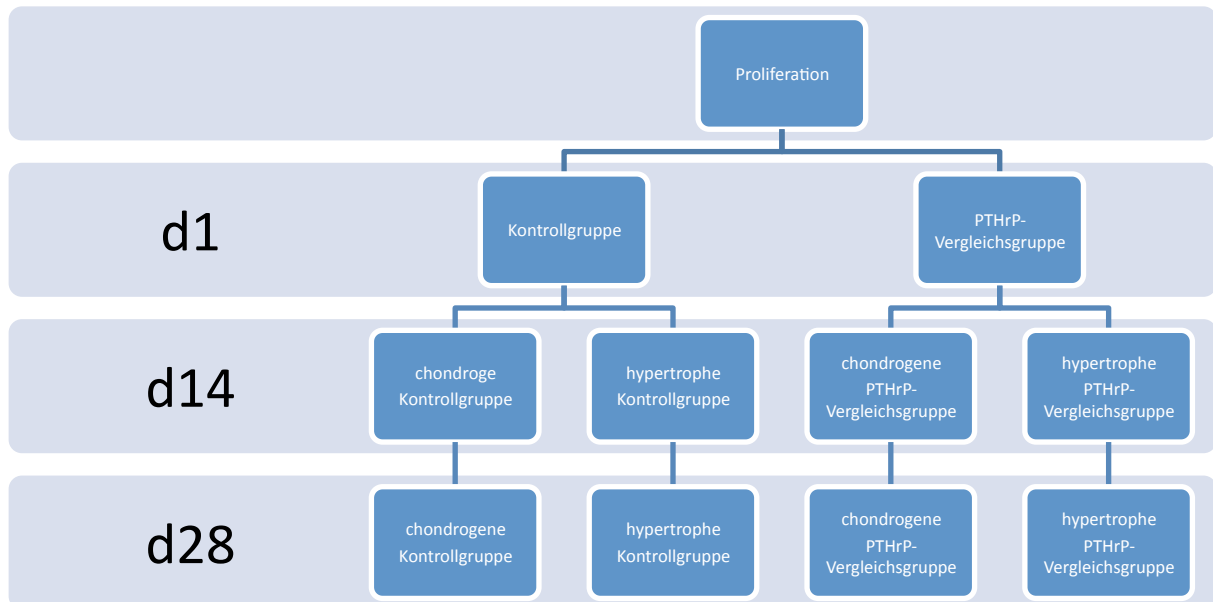


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU

## ZELLBIOLOGISCHE METHODEN UND ZELLHERKUNFT

Sämtliche der hier aufgeführten zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank Herasafe<sup>1</sup> durchgeführt. Die Zellen kultivierten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank CO<sub>2</sub> HeraCell 240<sup>1</sup> in Kulturflaschen<sup>2</sup>. Das Zellmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Arbeit mit den Zellkulturen war stets steril, das Material im Autoklav Melatronic 23<sup>3</sup> autoklaviert.

## ZELLGewinnung

Die für diese Versuche verwendeten mesenchymale Stammzellen stammen von insgesamt sechs männlichen Patienten im Alter zwischen 17 und 65 Jahren, die während einer Beckenkammoperation zur Zellentnahme punktiert wurden.

Das verwendete humane Material wurde am Universitätsklinikum Regensburg mit ausdrücklichem Einverständnis der Patienten zu Forschungszwecken entnommen. Die Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg hat für die durchgeführten Studien ein positives Votum abgegeben (00/134 vom 10/2000).

Nach der Punktion wurden die gewonnenen Zellen zur Gerinnungshemmung in einer verdünnten Heparinlösung bei 4°C eingelagert und innerhalb von 12 Stunden weiterverarbeitet. Im Weiteren wurde das Knochenmark mittels Percoll-Gradiententrennung aufgereinigt, die Fraktion mit den mononukleären Zellen (Dichte = 1,077 g/ml) in serumhaltiges MSC-Medium<sup>4</sup> überführt und die Lebendzellzahl bestimmt.

## PERCOLL-GRADIENTEN-TRENNUNG

Die Percoll-Gradiententrennung selektionierte mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark, indem sie mit Hilfe der Percoll-Lösung<sup>5</sup> einen Dichtegradienten erzeugte. Hierbei bildeten Erythrozyten und reife Granulozyten einen Bodensatz,

---

<sup>1</sup>Heraeus, Hanau

<sup>2</sup>Sarstedt, Nümbrecht

<sup>3</sup>Melag, Berlin

<sup>4</sup>DMEM 1,0g/l Low Glucose (Invitrogen, Karlsruhe), 10% Fetal Bovine Serum (PAN Biotech GmbH, Aldenbach), 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe), 1% 1M HEPES (Sigma Aldrich, Steinheim)

<sup>5</sup>22,05ml Percoll (Sigma Aldrich, Steinheim), 2,45ml 1,5M Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 10,50ml Tyrode's Lösung (9,73g Tyrode Salz [Sigma Aldrich, Steinheim], 0,2g NaHCO<sub>3</sub> [Merck, Darmstadt], 10ml Penicillin/Streptomycin [Invitrogen, Karlsruhe], 990ml Aqua dest.)

mononukleäre Zellen jedoch sammelten sich an dem Übergang des dünnflüssigen Aspirats zur Percoll-Lösung. Zuerst wurden 10 ml des Knochenmarkes mit 40 ml des serumhaltigem MSC-Mediums (siehe oben) verdünnt und die Suspension vorsichtig über 15 ml der Percoll-Lösung in 50 ml Falcon-Röhrchen<sup>6</sup> aufgebracht. Nach 15-minütiger Zentrifugation (1000U/min für 5 min; Multifuge 3S-R<sup>7</sup>) bei Raumtemperatur entnahm man die Fraktion mit der Dichte von 1,077 g/ml, um sie wiederum in 30 ml frischen serumhaltigen MSC-Medium zu resuspendieren. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur (1000U/min für 5 min; Multifuge 3S-R<sup>27</sup>), der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 30 ml serumhaltigem MSC-Medium gelöst. Anschließend wurde ein Vitalitätsassay durchgeführt und die Lebendzellzahl bestimmt.

#### VITALITÄTSASSAY UND BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL

Um die lebenden von den toten Zellen zu unterscheiden, wurde ein Vitalitätsassay durchgeführt. Hierzu mischte man 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,05% Trypanblau<sup>8</sup> versetzt. Nur tote Zellen nehmen den Farbstoff auf, sodass eine prozentuale Bestimmung der Zellzahl mikroskopisch<sup>9</sup> mit Hilfe der Neubauerzählkammer<sup>10</sup> möglich war. Mit der gezählten Anzahl lebender Zellen Z errechnete sich aus der Formel  $N = Z \times X \times 10^4$  die erzielte Zellzahl. X stand für den Faktor der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau und  $10^4$  entsprach dem Kammerfaktor.

#### AMPLIFIKATION

Die Zellen wurden auf 200.000 pro ml DMEM 1,0 g/l Low Glucose<sup>11</sup> eingestellt. Pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche<sup>12</sup> sähte man 200.000 Zellen aus und kultivierte sie mit je 15 ml zugegebenen DMEM 1,0 g/l Low Glucose<sup>6</sup> bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Mesenchymale Stammzellen adhärieren auf dem Boden der Kulturflaschen, sodass sie während des Mediumwechsels nicht abpipettiert bzw. so von noch vorhandenen anderen Zellen

---

<sup>6</sup>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

<sup>7</sup>Hereaus, Hanau

<sup>8</sup>Sigma Alderich, Steinheim

<sup>9</sup>Mikroskop Dialux 20 EB; Leitz, Wetzlar

<sup>10</sup>Brand, Giessen

<sup>11</sup>Invitrogen, Karlsruhe mit 10% Fetal Bovine Serum (PAN Biotech GmbH, Aldenbach)

<sup>12</sup>Sarstedt, Nümbrecht

selektioniert werden konnten und proliferierten. Erreichten die Zellen während dieser Proliferationsphase eine Konfluenz (Bedeckung des Kulturflaschenbodens) von ca. 80% wurde ihre Adhärenz gelöst.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Kulturflaschen mit 5 ml sterilem Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)<sup>13</sup> gespült. Nach Zugabe von je 3 ml Trypsin EDTA<sup>14</sup> wurden die Zellen für ca. 2-5 min unter vorsichtigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle<sup>15</sup>. Konnte mikroskopisch eine vollständige Ablösung festgestellt werden, wurde die Reaktion mit 5 ml DMEM 1,0 g/l Low Glucose<sup>14</sup> gestoppt und die Zellen zur Zentrifugation (1000U/min für 5 min; Multifuge 3S-R<sup>16</sup>) in 50 ml Falcon-Röhrchen<sup>17</sup> überführt. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in reinem DMEM 4,5 g/l High Glucose<sup>14</sup> resuspendiert, sodass man ungefähr eine Konzentration von 10<sup>18</sup> Zellen pro Milliliter erreichte.

#### DIFFERENZIERUNG

Während der Differenzierungsphase sollten die adulten mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von bestimmten Faktoren zu Chondrozyten differenzieren. Die gesamte Kulturdauer betrug 28 Tage. Ab Tag 14 induzierte bei der Hälfte der Proben der Kontroll- und PTHrP-Vergleichsgruppe ein entsprechendes Umstellen der Mediumzusammensetzung die Hypertrophie (siehe schematische Darstellung Abb. 1).

Das chondrogene Medium hatte folgende Zusammensetzung:

- DMEM 4,5 g/l High Glucose<sup>14</sup>
- 1% ITS+3<sup>18</sup>
- 50 µg/ml L-Ascorbinsäure (0,1024 g Ascorbinsäure<sup>18</sup>, 20 ml Tyrode's Lösung [siehe oben])
- 40 µg/ml L-4-Hydroxyprolin (Prolin 81709<sup>18</sup> in Dulbecco's PBS<sup>13</sup>)

---

<sup>13</sup>PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

<sup>14</sup>Invitrogen, Karlsruhe mit 10% Fetal Bovine Serum (PAN Biotech GmbH, Aldenbach)

<sup>15</sup>Mikroskop Dialux 20 EB; Leitz, Wetzlar

<sup>16</sup>Hereaus, Hanau

<sup>17</sup>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

<sup>18</sup>Sigma Aldrich, Steinheim

- 100 nM Dexamethason (0,00392 g 1 mM Dexamethason<sup>22</sup>, 10 ml 100% Ethanol<sup>19</sup>)
- 10 ng/ml TGF-β1 (TGF-Lyophilisat<sup>20</sup> in TGF-Puffer [12 ml H<sub>2</sub>OH<sub>2</sub>O<sup>21</sup>, 12,5 mg BSA Fraktion V<sup>22</sup>, 0,5ml 0,1N HCL<sup>21</sup>)
- 10% Penicillin/Streptomycin<sup>22</sup>

Die Hypertrophieinduktion ergab sich durch das Weglassen von Dexamethason und TGF-β sowie der Zugabe von 1 nM Trijodthyronin<sup>22</sup> (1mg T<sub>3</sub> in 1ml 1M NaOH<sup>21</sup>, 13,86 ml Dulbecco's PBS<sup>23</sup>), wie bereits in Vorversuchen belegt.

Begleitend zur Kontrollgruppe etablierte man eine PTHrP-Vergleichsgruppe, deren chondrogenes und hypertrophes Medium dem der Kontrolle entsprach, außer von zusätzlich 100 pM PTHrP<sup>22</sup>. Das Medium wurde bei allen Gruppen alle 2 Tage gewechselt.

#### ZELLKULTURSYSTEME

Während des Versuches standen zwei parallele Zellmodelle zur Verfügung. Einerseits als Kontrolle eine Aggregatkultur, andererseits eine mit Zellen beimpfte Trägermatrix. Beide wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95%-Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach der erfolgten Adhärenzlösung und der erneuter Auszählung der Zellen wurden sie zur Überführung in den Aggregatzustand auf 200.000 Zellen pro 300 µl chondrogenes Medium eingestellt. Je 300 µl Zellsuspension pipettierte man in ein Well einer 96-Well-Flat-Cell Tissue Culture Plate<sup>24</sup>. Anschließend wurde die Platte (1000U/min für 5 min; Multifuge 3S-R<sup>25</sup>) bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Für das zweite Kultursystem wurden die abgelösten Zellen mit einer Konzentration von 1.000.000 pro 40 µl in chondrogenem Medium resuspendiert und in eine Trägermatrix injiziert. Die Hyaluronsäurebenzylester(Hyaff)-Gelatine-Kompositmatrix wurde vor jedem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch nach einem patentiertem

---

<sup>19</sup>Baker, Deventer, NL

<sup>20</sup>R&D Systems, Wiesbaden

<sup>21</sup>Merck, Darmstadt

<sup>22</sup>Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>23</sup>PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

<sup>24</sup>Sarstedt, Nümbrecht

<sup>25</sup>Heraeus Hanau

Herstellungsverfahren (Europäisches Patent Nr.: PCT/EP99/09444) frisch hergestellt (Abb. 2). Das Hyaff-Gelatine Verhältnis betrug stets 70%–30%. Dieses Mischungsverhältnis hat sich in zahlreichen Vorversuchen sowohl mechanisch als auch biologisch bewährt. Die Porengröße der Trägermatrizes (Höhe 2mm, Ø5mm) betrug 350-450 µm (84).



ABBILDUNG 2: HYALURONMATRIX, HÖHE 2 MM, DURCHMESSER 5 MM (80)

Zur Injektion wurde auf eine um ca. die Hälfte gekürzte 100 µl Eppendorfspitze<sup>26</sup> eine 25 G Dosiernadel<sup>27</sup> aufgebracht und autoklaviert. So konnte die Zellsuspension direkt in die Mitte der Matrix appliziert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine möglichst homogene Zellverteilung in der porösen Matrix erreicht werden. Die Konstrukte wurden jeweils in die mittleren 8 Wells einer 24-Well-Flat-Cell Tissue Culture Plate<sup>28</sup> platziert, wobei in den restlichen Wells 1ml sterilem Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)<sup>29</sup> zugegeben wurde, um ein feuchtes Milieu zu schaffen. Nach ca. 1h Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95%-Luftfeuchtigkeit wurde 1 ml des angesetzten chondrogenen Mediums je Well zugegeben.

Während der 28 Tage dauernden Zellkultur wurden an Tag 1, 14 und 28 jeweils 4 Matrizes pro Gruppe entnommen, wobei jeweils zwei Konstrukte biochemisch und zwei histologisch weiterverarbeitet wurden. Von den Aggregaten wurden nur an Tag 28 jeweils 2 Aggregate pro Gruppe für histologische Untersuchungen entnommen.

---

<sup>26</sup>Eppendorf, Hamburg

<sup>27</sup>Farnell, Oberhaching

<sup>28</sup>Sarstedt, Nümbrecht

<sup>29</sup>PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

## NASSCHEMISCHE ANALYSEVERFAHREN

### ALKALISCHE PHOSPHATASE-AKTIVITÄT

Zur Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde jeweils an den Tagen 14, 21 und 28 sowohl im Aggregatmodell wie im Matrixmodell jeweils pro Probe 200 µl des 2-Tage-alten Mediums entnommen. Dieses pipettierte man in einer 96-Well-V-Platte<sup>30</sup> und zentrifugierte (3600U/min für 5 min; Multifuge 3S-R<sup>31</sup>). Jede Probe wurde zweifach bestimmt. Hierfür wurden zweimal jeweils 75µl in eine 96-well-flat-Platte<sup>32</sup> gegeben und mit 75 µl AP-Puffer<sup>33</sup> versetzt. Als Nullwert fungierte das reine DMEM 4,5 g/l High Glucose<sup>34</sup>.

Für die Herstellung der aktiven AP-Reagenz-Lösung wurden 2mg/ml AP-Substrat (p-Nitrophenol)<sup>35</sup> in AP-Puffer<sup>33</sup> bei Raumtemperatur gelöst.

Die Proben wurden nun mit dem Microplate Reader Tecan Genios<sup>36</sup> bei einer Wellenlänge von 405 nm und Raumtemperatur in 24 Zyklen alle 5 min kinetisch gemessen. Die enzymatische Aktivität errechnete sich aus der Steigung der linearen Anteile der einzelnen kinetischen Kurven.

### PAPAINVERDAU

Vor der Bestimmung des DNA- und Glykosaminoglykangehaltes wurde ein Papainverdau durchgeführt. Die an Tag 1, 14 und 28 entnommenen Proben zur biochemischen Auswertungen wurden mit einer Rasierklinge Double Edge Stainless Steel<sup>37</sup> halbiert und in einzelnen Kryoröhrchen (Cryogenic Vials 2 ml<sup>38</sup>) mit 250 µl Papainpuffer<sup>39</sup> gegeben. Die Matrices wurden im Homogenisator Xenox 40/E<sup>40</sup> klein gehexelt und weitere 150 µl Papainpuffer zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 60°C über Nacht.

---

<sup>30</sup>Falcon, Heidelberg

<sup>31</sup>Heraeus, Hanau

<sup>32</sup>Sarstedt, Nümbrecht

<sup>33</sup>1,88g 50mM Glycin (Merck, Darmstadt), 01017g 1mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt), 500ml Aqua dest., pH 10.5 (mit 2,7N NaOH [Merck Darmstadt] eingestellt)

<sup>34</sup>Invitrogen, Karlsruhe mit 10% Fetal Bovine Serum (PAN Biotech GmbH, Aldenbach)

<sup>35</sup>Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>36</sup>Tecan, Männedorf, CH

<sup>37</sup>Science Service, München

<sup>38</sup>Nalgene, Roskilde, DK

<sup>39</sup>0,726g/l L-Cystein (Merck, Darmstadt), 2,234g/l Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma Aldrich, Steinheim), 150mg/l Papain (Sigma Aldrich, Steinheim), Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A), pH 6.0

<sup>40</sup>Xenox, Niersbach

#### DNA-BESTIMMUNG

Die mit Papain verdauten Proben konnten nun im Verhältnis 1:15 mit TE-Puffer<sup>41</sup> für den DNA-Assay vorverdünnt werden. Für den Standard des DNA-Assays wurde lambda-DNA aus dem Kalbsthymus gewonnen (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit<sup>42</sup>), linear 1:2 ausgehend von 2 µg/ml als Höchststandard weiterverdünnt. Der reine TE-Puffer gab als Nullwert den Hintergrundwert an. Jeweils 100 µl des Standards, der vorverdünnten Probe und des Leerwertes wurden in eine 96-Well-Flat-Cell Tissue Culture Plate<sup>43</sup> pipettiert und mit je 100 µl Reagenz (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit<sup>41</sup> verdünnt 1:200 in TE-Puffer) gemischt. Die Messung erfolgte fluorimetrisch bei Wellenlänge 480 nm zur Anregung und 520 nm als Emission mit dem Microplate Reader Tecan Genios<sup>44</sup>.

#### GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT

Ebenfalls mit Papain verdaut wurde eine Stammlösung zur Erstellung der Standardkurve während des GAG-Assays. Hierzu wurde Chondroitinsulfat-A<sup>45</sup> in einer Konzentration von 8 mg/ml in Papainpuffer (siehe oben) gelöst.

Zur Bestimmung des GAG-Gehaltes war es zuerst notwendig, die verdauten Proben geeignet vorzuverdünnen. Anhand des Farbumschlages nach Zugabe von 250 µl DMMB-Lösung<sup>46</sup> zu 25 µl Probe von blau nach violett ließ sich eine geeignete Vorverdünnung für die einzelnen Proben festlegen, sodass die Werte auf der Standardkurve lagen. Die Vorverdünnung erfolgte mit dem Papain-Puffer, der bereits für den Verdau verwendet wurde, jedoch ohne Papain. Der Verdünnungsfaktor musste zusätzlich für jede einzelne Probe ermittelt und bei der Auswertung rechnerisch beachtet werden. 25 µl der vorverdünnten Proben wurde in eine 96-Well-Flat-Cell Tissue Culture Plate<sup>47</sup> vorgelegt und mit 250 µl DMMB-Lösung gemischt. Als Nullwert fungierte der Papainpuffer ohne Papain. Mit Hilfe der hergestellten Stammlösung des Chondroitinsulfat-A konnte zugleich eine

---

<sup>41</sup>1mM EDTA (Merck, Darmstadt), Tris-Puffer (24,225g Tris Pufferan [Roth, Karlsruhe], 37% HCl [Merck, Darmstadt], 1000ml Aqua dest., pH 7.0), Aqua dest., pH 7.5

<sup>42</sup>Invitrogen, Oregon, USA

<sup>43</sup>Sarstedt Nümbrecht

<sup>44</sup>Tecan, Männedorf, CH

<sup>45</sup>Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>46</sup>2,0g NaCl (Merck, Darmstadt), 18mg 1,9-Dimethylmethylenblau (Sigma Aldrich, Steinheim), 2,0ml Ameisensäure (Merck, Darmstadt), 5,0ml 100% Ethanol (Backer, Deventer, NL), pH 3.0

<sup>47</sup>Sarstedt, Nümbrecht

Standardkurve gemessen werden. Die Verdünnungsreihe erstreckte sich von 100 µg/ml bis 1,56 µg/ml und jeweils 25 µl wurden mit 250 µl DMMB-Lösung gemischt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem Microplate Reader Tecan Genios<sup>48</sup>.

#### HISTOLOGISCHE METHODEN

Zur histologischen Untersuchung an Tag 1, 14 und 28 entnommene Matrices wurden zuerst für 4 Stunden in Standard-Fixierungslösung<sup>49</sup> fixiert und anschließend für 5 min mit 0,1 M Phosphate Buffer Saline gespült. Die Pellets, entnommen an Tag 28, erhielten eine Fixationsdauer von 30 min und eine anschließende Spülung von 5 min. Beide Probearten wurden anschließend über eine aufsteigende Saccharosereihe (10%, 20%, 30% in 0,1 M D-(+)-Saccharose<sup>50</sup>, 0,1 M Phosphatpuffer<sup>51</sup>) für jeweils 10 min schrittweise entwässert. Anschließend inkubierten die Proben für eine Nacht im Tissue Tek<sup>52</sup>.

Die in Tissue Tek eingelegten Proben wurden im Block in flüssigem Stickstoff gefroren. In jedem Block wurde zusätzlich ein Kontrollgewebe (Rind) mit eingebettet. Das Anfertigen der Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten Mirkotom HM 500 OM<sup>53</sup> von einer Dicke von 10 µm.

Aufgebracht wurden die Schnitte auf vorbereitete Star Frost Objektträger<sup>54</sup>, die mit Gelatine<sup>55</sup> beschichtet waren. Die Schnitte wurden mikroskopiert und in den Vergrößerungen 4x und 10x fotografiert<sup>56</sup>.

---

<sup>48</sup>Tecan, Männedorf, CH

<sup>49</sup>4% Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, Steinheim), 1% Glutaraldehyd (Sigma Aldrich, Steinheim), 0,1M Phosphatpuffer (siehe unten)

<sup>50</sup>Roth, Karlsruhe

<sup>51</sup>0,2M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt), 0,2M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt)

<sup>52</sup>Sakura, Zoeterwoude, NL

<sup>53</sup>Microm, Berlin

<sup>54</sup>Knittel Gläser, Braunschweig

<sup>55</sup>50ml H<sub>2</sub>O, 075g Gelatine (Sigma Aldrich, Steinheim), 0,05g Chromalaun Chrom(III) Kaliumsulfatdecahydrat (Omikron, Neckarwestheim), 125µl Glutaraldehyd (Sigma Aldrich, Steinheim)

<sup>56</sup>Mikroskop Nikon Eclipse TE2000U (Nikon GmbH, Düsseldorf)

#### DIMETHYLMETHYLENBLAU

Zuerst wurden die Schnitte 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen, dann für 10 min in DMMB-Färbelösung<sup>57</sup> inkubiert und wiederum durch zweimaliges kurzes Eintauchen in H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Entwässerung wurden die Schnitte über eine Alkoholreihe entwässert. Hierzu wurden sie kurz in 96% Isopropanol<sup>58</sup> getaucht und je zweimal für 5 min in 100% Isopropanol<sup>61</sup> und 100% Xylol<sup>61</sup> und abschließend mit Deckgläsern<sup>59</sup> und DePex<sup>60</sup> eingedeckt. Die Färbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### ALKALISCHE PHOSPHATASE

Für die gewebespezifische Anfärbung der Alkalischen Phosphatase wurde das Diagnostic Alkaline Phosphatase Kit<sup>61</sup> verwendet. 1 ml Natrium Nitrit Lösung wurde mit 1ml FBB-Alkaline-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 45 ml destilliertes H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gegeben, zu dem 1 ml Naphtol AS-BI Alkaline Solution zugegeben wurde. Nach 15-minütiger Inkubation der Objektträger mit der hergestellten Lösung wurden die Schnitte zweifach mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und zur Gegenfärbung 2 min mit Neutral Red Solution inkubiert. Es folgte zweimaliges Spülen mit destilliertem H<sub>2</sub>O und Eindecken mit Deckgläsern<sup>62</sup> und Karion<sup>61</sup>. Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur.

#### IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die gleichen Schnitte verwendet, deren Herstellung oben beschrieben ist.

#### KOLLAGEN-II UND KOLLAGEN-X

Zu Beginn wurden die Schnitte 5 min mit Waschpuffer<sup>62</sup> gewässert und 30 min mit Peroxidase-Block<sup>63</sup> geblockt. Anschließend wurden sie dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und für 15 min mit Pepsin<sup>64</sup> verdaut. Wiederum wurden die Schnitte mit Waschpuffer (3 × 5 min) gewaschen. Anschließend wurde für 60 min ein

---

<sup>57</sup> 40mM NaCl (Merck, Darmstadt), 40 mM Glycin (Merck, Darmstadt), 46µl 1,9-Dimethylmethylenblau (Sigma Aldrich, Steinheim)

<sup>58</sup> Merck, Darmstadt

<sup>59</sup> Roth, Karlsruhe

<sup>60</sup> Serva, Heidelberg

<sup>61</sup> Sigma Aldrich, Steinheim

<sup>62</sup> 780ml 0,2M Trispuffer (s. S. 18), 24,96g NaCl (Merck, Darmstadt), 2220ml Aqua dest.

<sup>63</sup> 100ml/l 100% Methanol (Merck, Darmstadt), 100ml/l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt), in Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)

<sup>64</sup> 1mg/ml Pepsin (Sigma Aldrich, Steinheim) in McLlavaine (0,1M Citronensäure-Monohydrat [Merck, Darmstadt], 0,2M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat [Merck, Darmstadt], pH 3,6)

Blockingpuffer<sup>65</sup> zugegeben. Es folgte die Zugabe des primären Kollagen-II-Antikörpers (mouse antitype II collagen IgG1, 1:100<sup>66</sup>) und Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht. Der Negativkontrolle wurde kein Antikörper zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit Waschpuffer gewaschen (3 × 5 min), bevor der sekundären Antikörper (goat anti mouse IgG, 1:100<sup>67</sup>) zugegeben wurde, und sie bei Raumtemperatur für 60 min inkubierten. Nachdem sie wiederum gewaschen wurden (3 × 5 min), wurden sie mit der ABC-Lösung<sup>68</sup> behandelt und nochmals gewaschen (3 × 5 min). Abschließend wurden die Schnitte mit DAB-Lösung<sup>69</sup> entwickelt, mit Alkohol entwässert (kurz in 96% Isopropanol<sup>68</sup>, 2 × 5 min 100% Isopropanol<sup>68</sup>, 2 × 5 min Xylol<sup>68</sup>) und mit Deckgläsern<sup>70</sup> und DePex<sup>71</sup> eingedeckt.

Für die Collagen-X-Färbung<sup>72</sup> wird im Schema zwischen Schritt 3. und 4. zusätzlich ein 60-minütige Inkubation bei 37°C mit Hyaluronidase<sup>73</sup> und anschließend dreimaligen Waschen (je 5 min) durchgeführt. Die Inkubation über Nacht erfolgte hier bei 4°C.

Wenn nicht anders angegeben wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

---

<sup>65</sup> 60ml Aqua dest., 120ml 0,2 M Trispuffer (s. S. 18), 2400mg 0,8% NaCl (Merck, Darmstadt), 60 ml Triton X-100 (Sigma Aldrich, Steinheim), 30ml 10% Ziegenserum (Invitrogen, Karlsruhe), 30ml 10% Fetal Bovine Serum (PAN Biotech GmbH, Aldenbach)

<sup>66</sup> Calbiochem, Darmstadt

<sup>67</sup> Dianova, Hamburg

<sup>68</sup> Vectorlabs, Grünberg

<sup>69</sup> 9ml 1M m-PBS-Puffer (47,2g Kaliumdihydrogenphosphat [Merck, Darmstadt], 6,6g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat [Merck, Darmstadt], 36,0g NaCl [Merck, Darmstadt], mit Aqua dest. auf 500 g auffüllen), 1ml DAB-Stammlösung (10mg BSA [Sigma Aldrich, Steinheim], 50mg 0,5% Diaminobenzidin [Sigma Aldrich, Steinheim], 10ml Aqua dest.), 400µl NiCo-Lösung (100 mg NiCl<sub>2</sub> [Sigma Aldrich, Steinheim], 5mg CoCl<sub>2</sub> [Sigma Aldrich, Steinheim], 10 mg BSA [Sigma Aldrich, Steinheim], 10 ml Aqua dest.), 6µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)

<sup>70</sup> Roth, Karlsruhe

<sup>71</sup> Serva, Heidelberg

<sup>72</sup> Kollagen-X-Antikörper von Quartett GmbH, Berlin

<sup>73</sup> 2mg/ml Hyaluronidase (Sigma Aldrich, Steinheim) in 0,5M Essigsäure (Merck, Darmstadt), pH 6.0

## STATISTIK

Je Bedingung standen vier Proben für die biochemischen Messungen zur Verfügung. Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität im Medium wurde zweifach gemessen und aus den Messwerten ein Mittelwert und eine Standardabweichung gebildet. Die Umwandlung in Prozentangaben erfolgte durch den Bezug der einzelnen Probenwerte auf den Mittelwert der chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 14. Die Proben für die DNA- und GAG-Assays wurden dreifach gemessen und die Messwerte mit zwei multipliziert, da es sich nur um Hälften der Matrices handelte. Hieraus errechnete sich im Anschluss ein Mittelwert mit Standardabweichung für die einzelne Bedingung. Die Umwandlung in Prozentangaben erfolgte bei der DNA- und GAG-Auswertung durch den Bezug der Probenwerte auf den Mittelwert der chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1.

Zur Auswertung der Signifikanz wurde bei Rohwerten der Student's-T-Test auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als signifikant bzw.  $p < 0,01$  als hochsignifikant verwendet. Wurden die Werte auf einen Standardwert und so in Prozent umgewandelt und bei dem GAG-DNA-Verhältnis, fungierte hier der Mann-Whitney-U-Test, ebenfalls mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als signifikant bzw.  $p < 0,01$  als hochsignifikant. Die Berechnung erfolgte mit Microsoft Office Excell 2007<sup>74</sup> und der Ergänzungssoftware WinSTAT<sup>75</sup>, die grafische Darstellung mit SigmaPlot 10.0 für Windows<sup>76</sup>.

---

<sup>74</sup>Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

<sup>75</sup>R. Fitch Software, Bad Krotzing

<sup>76</sup>Systat Software GmbH, Erkrath, Germany

## ERGEBNISSE

### NASSCHEMISCHE VERFAHREN

#### ZELLZAHL

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe der DNA-Konzentration bestimmt. Hierzu wurden an drei Zeitpunkten (Tag 1, 14, 28) während der vierwöchigen Kulturdauer jeweils 2 Konstrukte je Bedingung entnommen, diese halbiert, die vier Proben mit Papain verdaut und mit dem DNA-KIT Quant-iT™ PicoGreen® behandelt. Somit resultierte eine Fallzahl n=4.

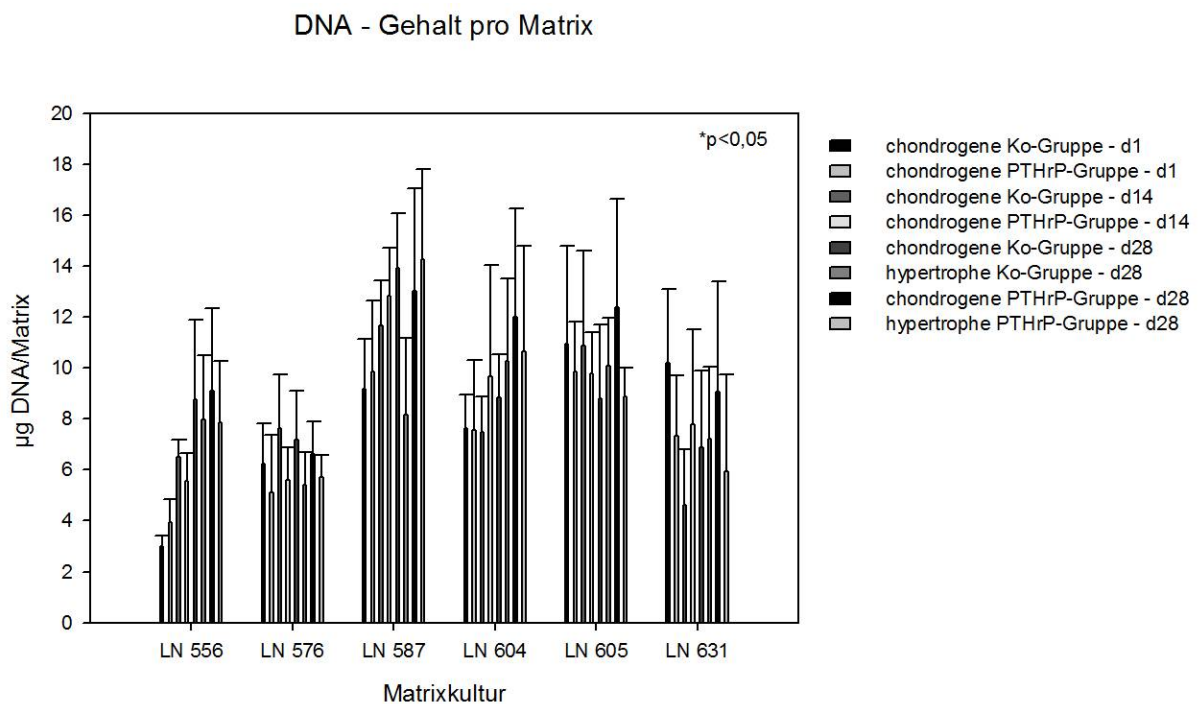


ABBILDUNG 3: DNA-GEHALT PRO MATRIX IN µG AN DEN JEWEILIGEN ENTNAHMETAGEN MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4

Der DNA-Gehalt der einzelnen Matrizes an den Tagen 1, 14 und 28 unterlag keiner Gesetzmäßigkeit (Abb. 3). In den Kontrollgruppen der einzelnen Experimente kam es weder unter chondrogenen noch hypertrophen Bedingungen zu keinerlei gleichmäßigen Veränderungen des DNA-Gehaltes über den 28-tägigen Kulturzeitraum (Abb. 3 und Tab.1). Gleiches galt für die PTHrP-Vergleichsgruppen (Abb. 3 und Tab.1). Ebenso ließ sich keine Regelmäßigkeit beim direkten Vergleich der chondrogenen mit der hypertrophen Bedingung an Tag 28 jeweils in den Kontrollgruppen wie auch in den PTHrP-Vergleichsgruppen erkennen (Abb. 3 und Tab.1). Zwischen der Kontroll- und PTHrP-Vergleichsgruppen zeigten sich weder an

Tag 1, 14 und 28 noch in der hypertrophen Gruppe ebenfalls keine regelmäßigen Unterschiede (Abb. 3 und Tab.1).

Vergleich DNA-Gehalt pro Matrix						
Kontrolle	LN 556	LN 576	LN 587	LN 604	LN 605	LN 631
d1-d14	0,0001**	0,3368	0,1126	0,8742	0,9729	0,0394*
d14-d28	0,2484	0,7595	0,0272*	0,2438	0,4719	0,3223
d1-d28/cho	0,0353*	0,4855	0,0165*	0,2833	0,34	0,2082
d1-d28/hyp	0,014*	0,516	0,0844	0,0054**	0,6336	0,7161
d28/cho-d28/hyp	0,8692	0,1885	0,5771	0,0313*	0,2805	0,5021
<b>PTHrP</b>						
d1-d14	0,0668	0,6278	0,1554	0,4801	0,9232	0,8036
d14-d28	0,1904	0,796	0,057	0,8222	0,8235	0,9183
d1-d28/cho	0,061	0,7523	0,4779	0,2238	0,8644	0,7359
d1-d28/hyp	0,0531	0,4893	0,1207	0,3071	0,2413	0,5953
d28/cho-d28/hyp	0,9532	0,5463	0,0492*	0,8836	0,36	0,4759
<b>Kontrolle-PTHrP</b>						
d1-d1	0,1449	0,3637	0,7374	0,9655	0,4656	0,2011
d14-d14	0,186	0,1459	0,2698	0,4177	0,6546	0,1392
d28/cho-d28/cho	0,7267	0,1568	0,0326*	0,361	0,5417	0,6474
d28/hyp/d28/hyp	0,5129	0,723	0,613	0,6087	0,251	0,384

TABELLE 1: SIGNIFIKANZWERTE DES STUDENT'S T-TEST. VERGLEICH DNA-GEHALT PRO MATRIX EINZELNER BEDINGUNGEN.\*P<0,05, \*\*P<0,01.

Zum besseren Vergleich der Kontrollgruppe mit der PTHrP-Vergleichsgruppe wurde als Standard der Mittelwert der Bedingung chondrogene Kontrolle Tag 1 festgelegt und die Mittelwerte der Messwerte der einzelnen Proben hierauf bezogen (Abb. 4). Die errechneten Werte wurden gemittelt und mit der Standardabweichung dargestellt.

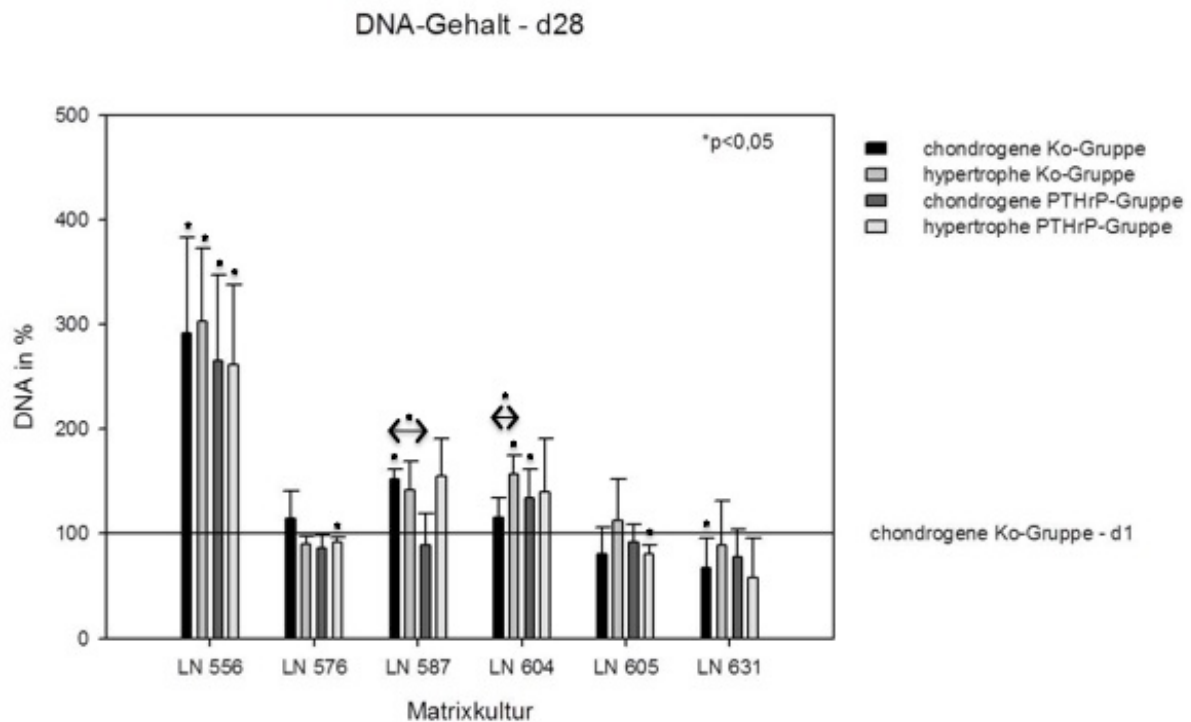


ABBILDUNG 4: DNA-GEHALT PRO MATRIX AN TAG 28 NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 1, ANGEGBEN IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

Auch hier ließen sich keine Gesetzmäßigkeiten nachweisen. Der DNA-Gehalt der Matrizes aller vier Bedingungen wies an Tag 28 keinen regelmäßigen signifikanten Unterschied in Bezug auf Tag 1 auf (Abb. 4). Im Vergleich der einzelnen Bedingungen untereinander konnte ebenfalls an Tag 28 keine Veränderung zwischen den chondrogenen und hypertrophen Bedingungen sowohl in der Kontroll- wie auch in der PTHrP-Vergleichsgruppe ermittelt werden. Das gleiche galt für den Vergleich der Kontroll- mit der PTHrP-Vergleichsgruppe.

## GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT

Der Glykosaminoglykangehalt stieg in allen sechs Experimenten sowohl in der Kontroll- als auch in der PTHrP-Vergleichsgruppe über den gesamten Kulturzeitraum an, wenn auch der Anstieg unter chondrogenen Bedingungen stärker ausfiel, als unter hypertrophen Bedingungen (Abb. 5).

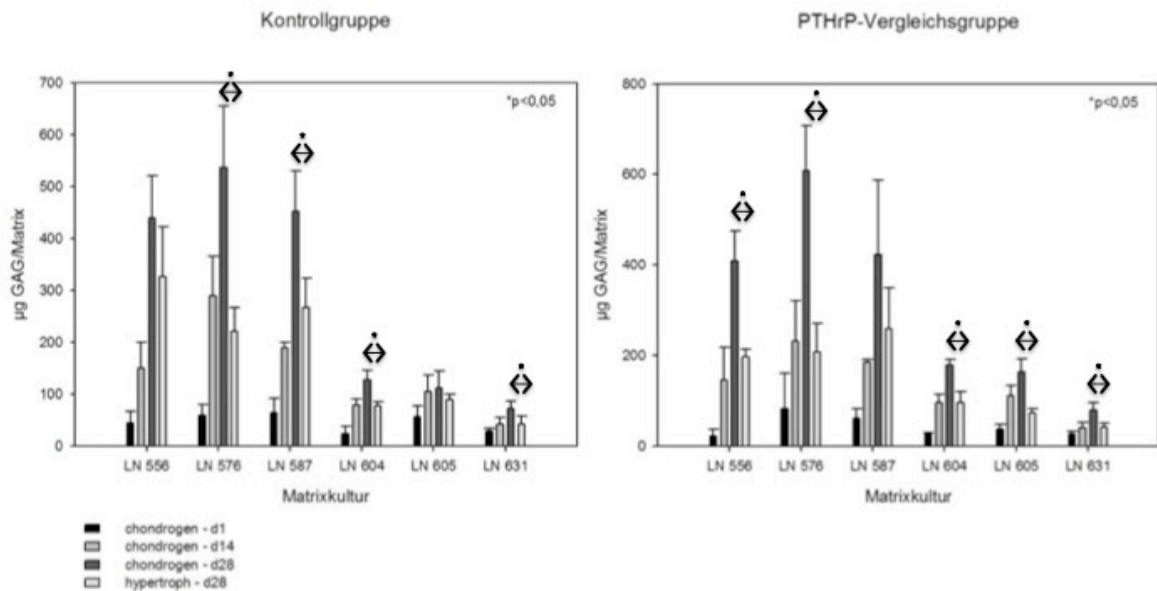


ABBILDUNG 5: GAG-GEHALT PRO MATRIX AN TAG 28 IN µG, ANGEGEBEN MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

Im Verlauf der vierwöchigen Kulturdauer stieg innerhalb der ersten 14 Tage der GAG-Gehalt pro Matrix in der chondrogenen Kontrollgruppe in fünf von sechs Experimenten signifikant an (Abb. 5 und Tab. 2). An Tag 28 war der Wert für alle sechs Experimente in der chondrogenen Kontrollgruppe und für fünf in der hypertrophen Kontrollgruppe signifikant oder hoch signifikant zu Tag 1 erhöht (Abb. 5 und Tab. 2). In der Kontrollgruppe ließ sich bei allen Spenderzellen an Tag 28 eine stärkere Zunahme des GAG-Gehaltes unter chondrogenen gegenüber den hypertrophen Bedingungen nachweisen, in zwei Fällen war der Unterschied signifikant und in zwei hochsignifikant (Abb. 5 und Tab. 2). In der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe zeigte sich innerhalb der ersten 14 Tage bei fünf und nach 28 Tagen bei allen sechs Experimenten eine signifikante oder hochsignifikante Steigerung des GAG-Gehaltes pro Matrix (Abb. 5 und Tab. 2). Die Werte der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe waren bei vier Experimenten signifikant an Tag 28 gegenüber Tag 1 erhöht. In fünf Fällen war der Wert der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe zur hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe an Tag 28

signifikant oder hoch signifikant erhöht (Abb. 5). Für drei Spender ergab sich hierfür eine signifikante Änderung parallel in der Kontroll- wie auch in der PTHrP-Vergleichsgruppe (LN 576, LN 604, und LN 631). Beim direkten Vergleich der einzelnen Bedingungen der Kontrollgruppe mit den jeweiligen der PTHrP-Vergleichsgruppe fanden sich hingegen keine Gesetzmäßigkeiten (Tab. 2).

Vergleich GAG-Gehalt pro Matrix						
Kontrolle	LN 556	LN 576	LN 587	LN 604	LN 605	LN 631
d1-d14	0,024*	0,012*	0,002**	0,001**	0,05*	0,19
d14-d28	0,003**	0,028*	0,003**	0,005**	0,814	0,024*
d1-d28/cho	0,003**	0,005**	0,0002**	0,00013**	0,046*	0,007**
d1-d28/hyp	0,017*	0,003**	0,0001**	0,001**	0,001**	0,215
d28/cho-d28/hyp	0,144	0,014*	0,004**	0,007**	0,325	0,025*
PTHrP						
d1-d14	0,018*	0,033*	0,00001**	0,003**	0,007**	0,146
d14-d28	0,002**	0,002**	0,077	0,0003**	0,044*	0,016*
d1-d28/cho	0,001**	0,001**	0,028*	0,0001**	0,003*	0,007**
d1-d28/hyp	0,00003**	0,052	0,037*	0,013*	0,001*	0,056
d28/cho-d28/hyp	0,009**	0,002**	0,162	0,004**	0,008*	0,019*
Kontrolle-PTHrP						
d1-d1	0,224	0,833	0,862	0,657	0,041	0,579
d14-d14	0,912	0,369	0,452	0,137	0,756	0,892
d28/cho-d28/cho	0,634	0,444	0,772	0,004**	0,072	0,572
d28/hyp/d28/hyp	0,123	0,764	0,786	0,27	0,041*	0,936

TABELLE 2: SIGNIFIKANZWERTE DES STUDENT'S T-TEST. VERGLEICH GAG-GEHALT PRO MATRIX EINZELNER BEDINGUNGEN.\*P<0,05, \*\*P<0,01.

Wiederum zum besseren Vergleich der Kontrollgruppe mit der PTHrP-Vergleichsgruppe wurden auch hierfür die Werte auf die chondrogene Kontrolle Tag 1 bezogen und in Prozentangaben umgewandelt (Abb. 6). Dies zeigte nochmals, dass der GAG-Gehalt der Matrices an Tag 28 signifikant mit einer Ausnahme (hypertrophe PTHrP-Gruppe LN 631) über dem an Tag 1 lag. In vier Experimenten zeigte sich ein höherer GAG-Wert der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe gegenüber chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 28, einmal mit einer signifikanten Änderung. Unter hypertrophen Bedingungen war der Wert der PTHrP-Vergleichsgruppe nur dreimal höher als in der Kontrolle, jedoch einmal signifikant vermindert (Abb. 6).

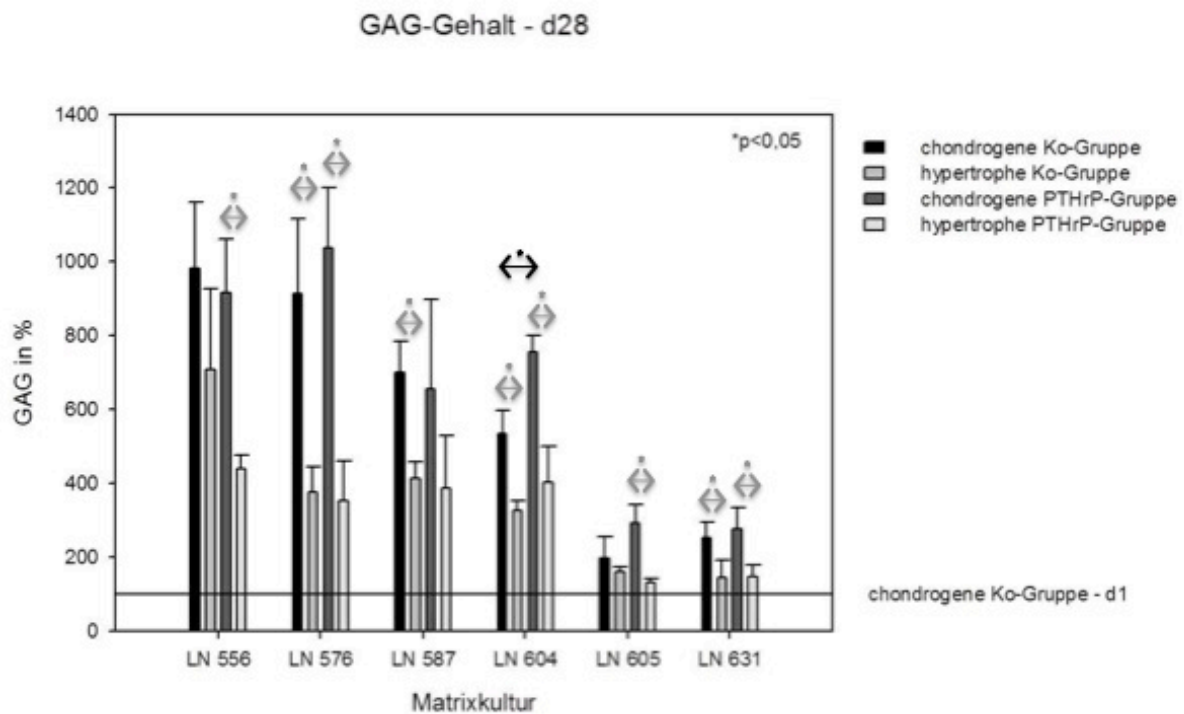


ABBILDUNG 6: GAG-GEHALT PRO MATRIX AN TAG 28 NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 1, ANGEGBEN IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

#### GLYKOSAMINOGLYKANGEHALT BEZOGEN AUF DNA-GEHALT

Im Anschluss wurde aus den Mittelwerten der einzelnen vier Proben das Verhältnis von Glykosaminoglykan-Gehalt zur DNA-Konzentration pro Matrix errechnet. Der GAG-Mittelwert wurde durch den DNA-Mittelwert dividiert und somit vier Verhältniswerte pro Bedingung gebildet. Diese wurden wiederum gemittelt und als ein Gesamtwert pro Bedingung mit der Standardabweichung unten dargestellt.

Das Verhältnis stieg über den gesamten Kulturzeitraum sowohl in der Kontroll- wie auch in der PTHrP-Vergleichsgruppe bis Tag 28 an (Abb. 7). Mit Ausnahme der PTHrP-Vergleichsgruppe des LN 631 war das GAG-DNA-Verhältnis in den chondrogenen Gruppen an Tag 28 stets größer, als in den hypertrophen Gruppen (Abb. 7). Nach 14 Tagen war das Verhältnis bereits bei fünf von sechs Spenderzellen in der Kontrollgruppe signifikant zu Tag 1 gesteigert, an Tag 28 sowohl unter chondrogenen wie auch hypertrophen Bedingungen bei allen sechs Spenderzellen (Abb. 7 und Tab. 3).

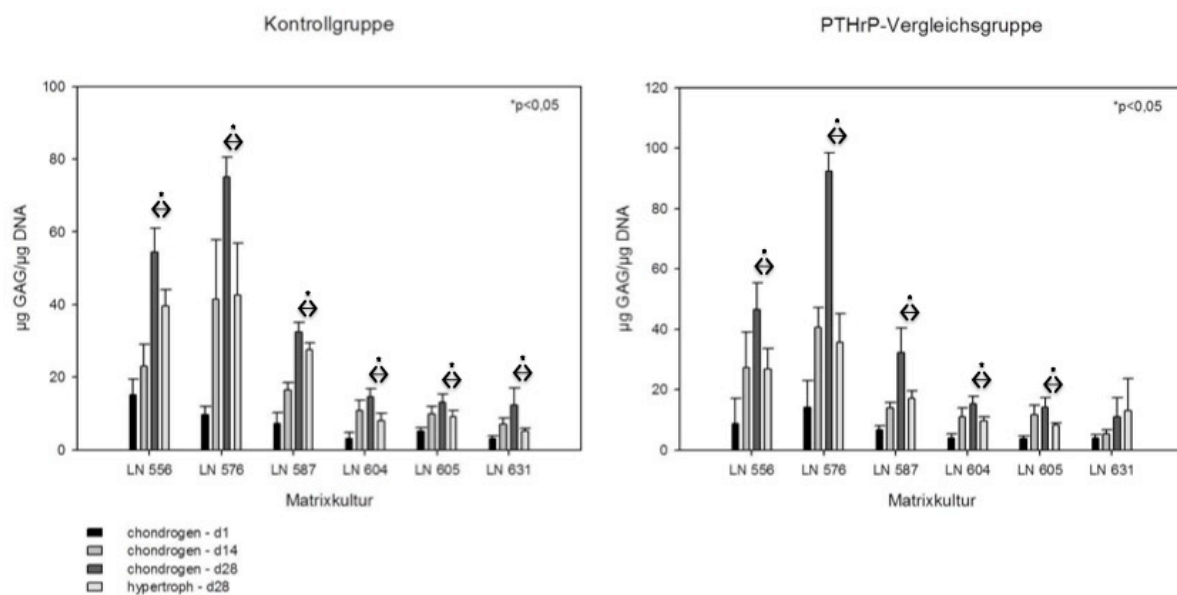


ABBILDUNG 7: GAG-DNA-VERHÄLNISS AN TAG 28, ANGEZEIGT IN  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

In der Kontrollgruppe ließ sich für alle sechs Spenderzellen eine signifikant stärkere Steigerung des GAG-DNA-Verhältnisses nach einer 28-tägigen Kulturdauer unter chondrogenen Bedingungen im Vergleich zur hypertrophen Gruppe nachweisen (Abb. 7). In der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe war das Verhältnis nach zwei Wochen bei fünf, nach vier Wochen bei sechs Spenderzellen im Vergleich zu

Tag 1 gesteigert (Abb. 7 und Tab. 3). In der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe kam es bei fünf Spenderzellen nach 28 Tagen zu einer Erhöhung des Verhältnisses (Abb. 7 und Tab. 3). Nach 28 Tagen ließ sich bei fünf von sechs Experimenten in der PTHrP-Vergleichsgruppe ein signifikant höherer Wert des GAG-DNA-Verhältnisses unter chondrogenen gegenüber den hypertrophen Bedingungen nachweisen (Abb. 7). Vergleiche zwischen den einzelnen Bedingungen der Kontroll- und PTHrP-Vergleichsgruppe erbrachten jedoch keine wesentlichen Unterschiede (Tab. 3).

Vergleich GAG/DNA pro Matrix						
Kontrolle	LN 556	LN 576	LN 587	LN 604	LN 605	LN 631
d1-d14	0,15	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*
d14-d28	0,021*	0,021*	0,021*	0,25	0,083	0,043*
d1-d28/cho	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*
d1-d28/hyp	0,021*	0,021*	0,021*	0,043*	0,021*	0,043*
d28/cho-d28/hyp	0,021*	0,021*	0,043*	0,021*	0,043*	0,021*
PTHrP						
d1-d14	0,043*	0,021*	0,034*	0,021*	0,021*	0,25
d14-d28	0,043*	0,021*	0,034*	0,25	0,39	0,083
d1-d28/cho	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*
d1-d28/hyp	0,043*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,083
d28/cho-d28/hyp	0,043*	0,021*	0,021*	0,021*	0,043*	1
Kontrolle-PTHrP						
d1-d1	0,25	0,56	1	0,39	0,083	0,25
d14-d14	0,56	0,56	0,289	0,77	0,56	0,15
d28/cho-d28/cho	0,39	0,021*	0,564	0,77	0,56	0,56
d28/hyp/d28/hyp	0,043*	0,56	0,021*	0,39	0,56	0,15

TABELLE 3: SIGNIFIKANZWERTE MANN-WHITNEY-U-TEST. VERGLEICH DES GAG-DNA-VERHÄLTNISSES EINZELNEN BEDINGUNGEN.\*P<0,05.

Normalisiert zur chondrogenen Kontrolle an Tag 1 war der Wert der Kontrollgruppe wiederum in allen Experimenten unter chondrogenen gegenüber den hypertrophen Bedingungen signifikant erhöht, in der PTHrP-Vergleichsgruppe waren es fünf (Abb. 8). In drei Experimenten war der Wert der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe erhöht, jedoch nur einmal signifikant (Abb. 8). Ebenfalls bei vier Spenderzellen war der Wert der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe im Vergleich mit der hypertrophen Kontrollgruppe vermindert, zweimal signifikant (Abb. 8).

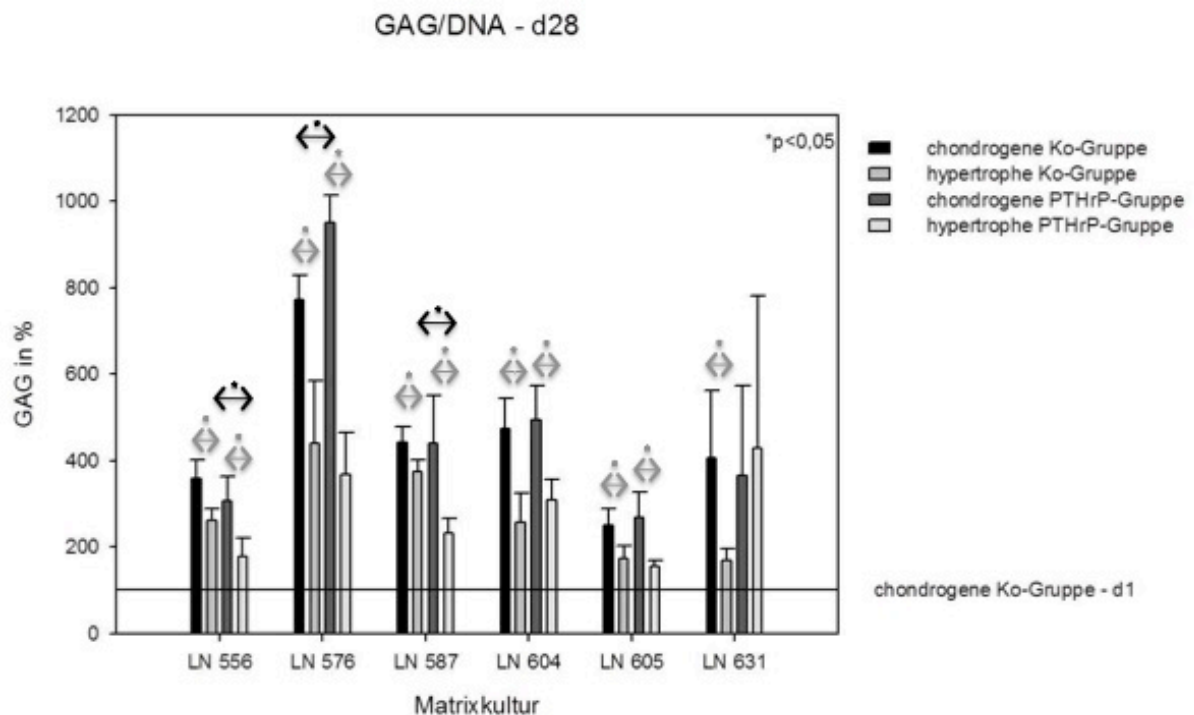


ABBILDUNG 8: GAG-DNA-VERHÄLTNIS AN TAG 28 NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 1, ANGEZEIGT IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \* P<0,05

## ALKALISCHE-PHOPHATASE-AKTIVITÄT

Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität wurde an den Tagen 14, 21 und 28 gemessen. Zur besseren Darstellung sind die Werte für die folgenden Grafiken auf den Mittelwert der chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 14 bezogen und so in Prozentangaben umgewandelt.

Die Messung an Tag 14 ergab, dass es nach zweiwöchiger Kulturdauer bei fünf von sechs Experimenten in der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe zu einer hoch signifikanten Verminderung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe gekommen ist (Abb. 9).

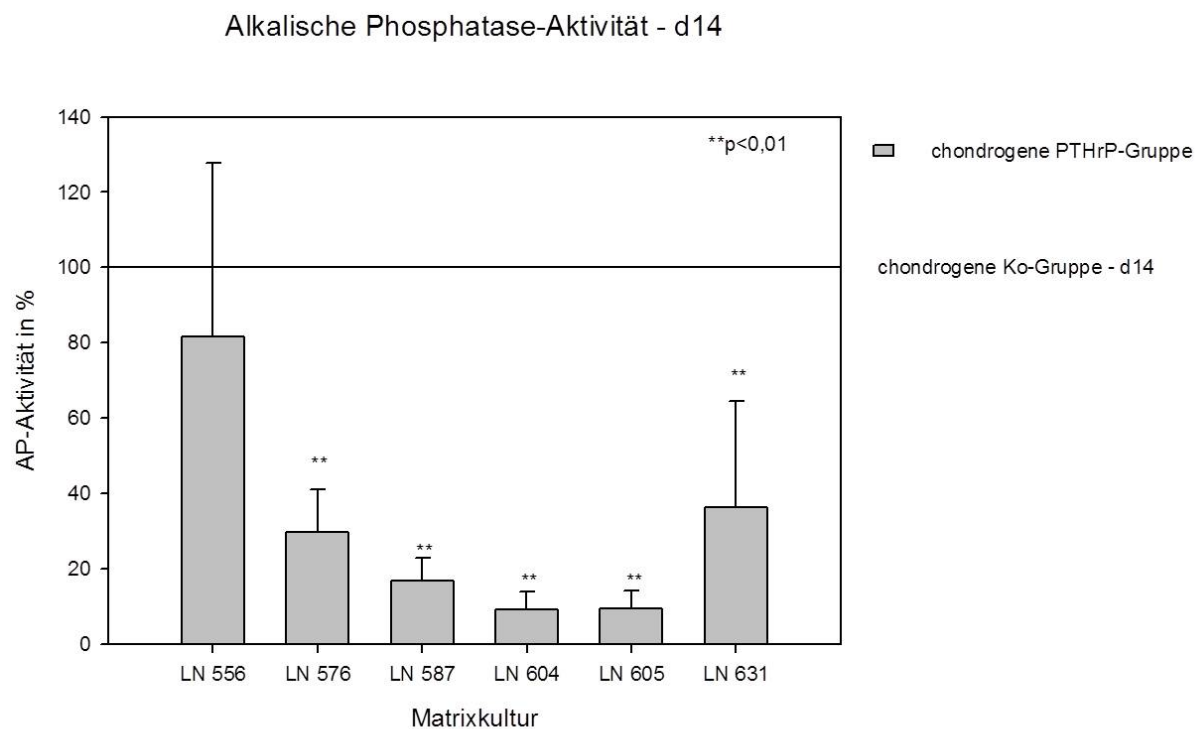


ABBILDUNG 9: ALKALISCHE PHOSPHATASE-AKTIVITÄT AN TAG 14, NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 14, ANGEGBEN IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=12; \*P<0,05

An Tag 21 war der Wert der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität in allen Experimenten meist signifikant verändert (Abb.10). In den Kontrollgruppen waren an Tag 21 jeweils fünf von sechs Fällen unter chondrogenen und sechs von sechs unter hypertrophen Bedingungen gegenüber Tag 14 hochsignifikant gesteigert (Abb.10). In der PTHrP-Vergleichsgruppe fanden sich vier signifikante Steigerungen in den chondrogenen und drei in den hypertrophen Gruppen (Abb.10). In vier von sechs Experimenten zeigte sich eine signifikante Steigerung der hypertrophen gegenüber der

chondrogenen Bedingung in der Kontrollgruppe an Tag 21 und vier von sechs in der PTHrP-Vergleichsgruppe (Abb. 10). Bei den Spenderzellen LN 556, LN 576 und LN 587 entstanden somit parallele Veränderungen in der Kontroll- und PTHrP-Vergleichsgruppe. Die chondrogene PTHrP-Vergleichsgruppe war im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe in alle Experimenten an Tag 21 vermindert, in fünf Experimenten (mit Ausnahme des LN 556) ließen sich hochsignifikante Unterschiede nachweisen (Abb. 10). Die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe war in fünf Fällen im Vergleich zur hypertrophen Kontrollgruppe an Tag 21 vermindert, in vier Fällen war der Unterschied hochsignifikant (Abb. 10).

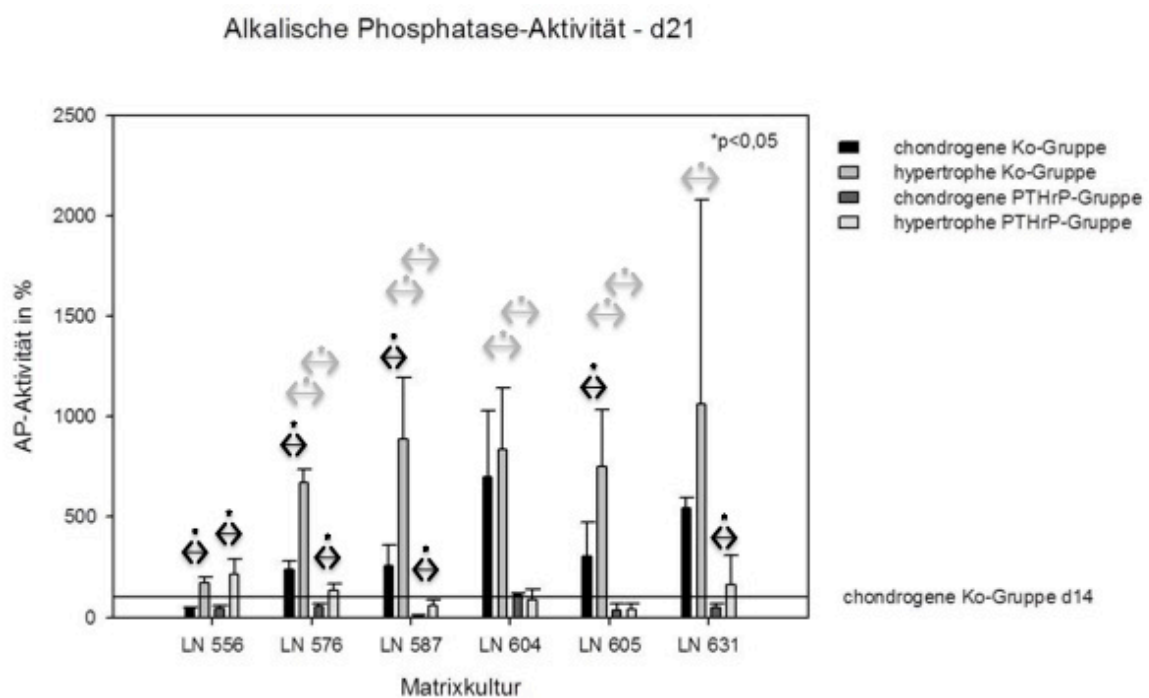


ABBILDUNG 10: ALKALISCHE-PHOSPHATASE-AKTIVITÄT AN TAG 21 NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 14, ANGEZEIGT IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

An Tag 28 war die Alkalische-Phosphatase-Aktivität von fünf chondrogenen und fünf hypertrophen Kontrollgruppen im Vergleich zu Tag 14 hochsignifikant gesteigert, der der hypertrophen Gruppe von LN 631 signifikant (Abb.11). In der PTHrP-Vergleichsgruppe war der Wert von einer chondrogenen und zwei hypertrophen Gruppen signifikant erhöht (Abb.11). Der Vergleich der hypertrophen mit der chondrogenen Bedingung an Tag 28 erbrachte in der Kontrollgruppe vier und in der PTHrP-Vergleichsgruppe drei Spenderzellen, deren hypertrophe Bedingungen verglichen mit den chondrogenen einen signifikant höheren Wert aufwiesen (Abb.11). Die Werte der chondrogenen und hypertrophen Kontrollgruppe lagen meist

hochsignifikant oder signifikant über den entsprechenden der PTHrP-Vergleichsgruppe (Abb.11). Die alleinige Ausnahme bildete die hypertrophe Bedingung des LN 631.

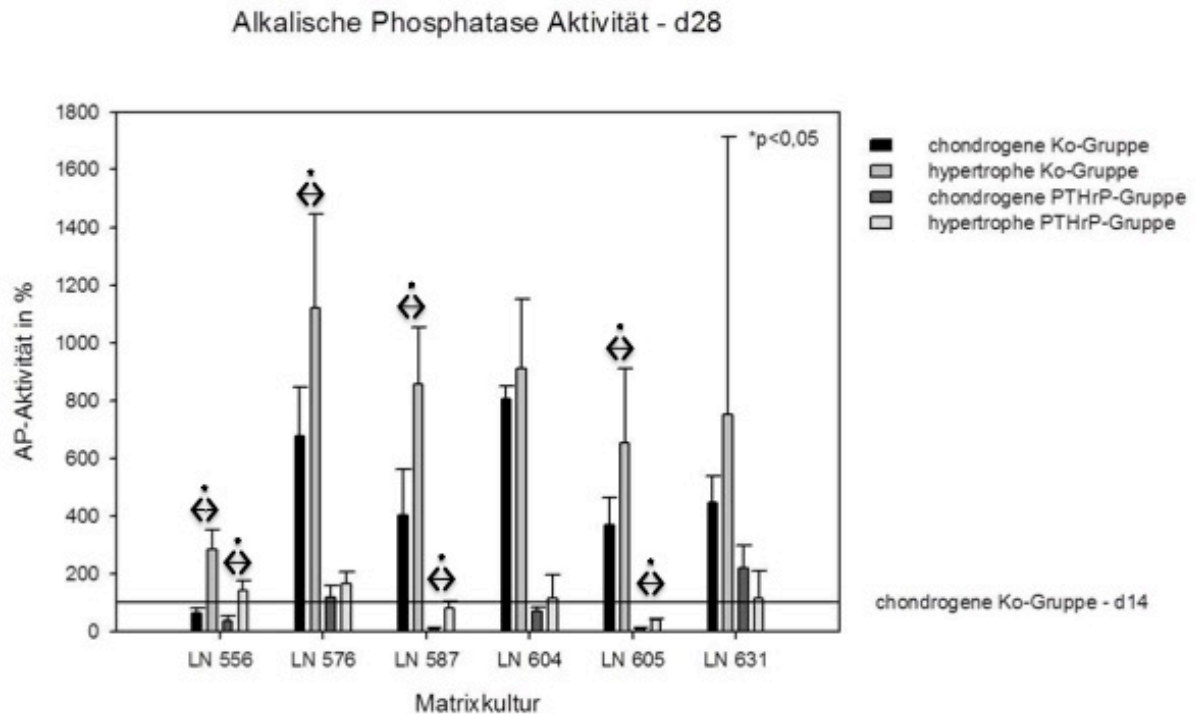


ABBILDUNG 11: ALKALISCHE-PHOSPHATASE-AKTIVITÄT AN TAG 28 NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 14, ANGEGBEN IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=4; \*P<0,05

Für LN 587, LN 604, LN 605 und LN 631 wurde ebenfalls eine Pelletkultur angelegt und deren Alkalische-Phosphatase-Aktivität bestimmt. Die Errechnung erfolgte auf oben beschriebene Weise analog zur Matrixkultur, der Standard wurde ebenfalls als Tag 14 der chondrogenen Kontrolle der Pelletkultur festgelegt. Jeweils in drei Fällen waren die Werte der chondrogenen und hypertrophen Bedingung in der Kontrollgruppe an Tag 28 signifikant gegenüber der chondrogenen Kontrolle an Tag 14 gesteigert (Abb. 12). Für zwei der vier Spenderzellen ergab sich in der Pelletkultur ein signifikanter Anstieg der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität in der hypertrophen Kontrollgruppe im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 28 (Abb. 12). In der PTHrP-Vergleichsgruppe waren es ebenfalls zwei (Abb. 12). Alle Werte der chondrogenen und hypertrophen Kontrollgruppen lagen signifikant über denen, der PTHrP-Vergleichsgruppe (Abb. 12). Der geringe Anstieg der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität der hypertrophen Kontrolle des Spenders LN 605 in Zusammenschau mit den histologischen Befunden (siehe weiter unten) hat seine

Ursache darin, dass die Zellen in dieser Gruppe womöglich bereits de-differenziert waren.

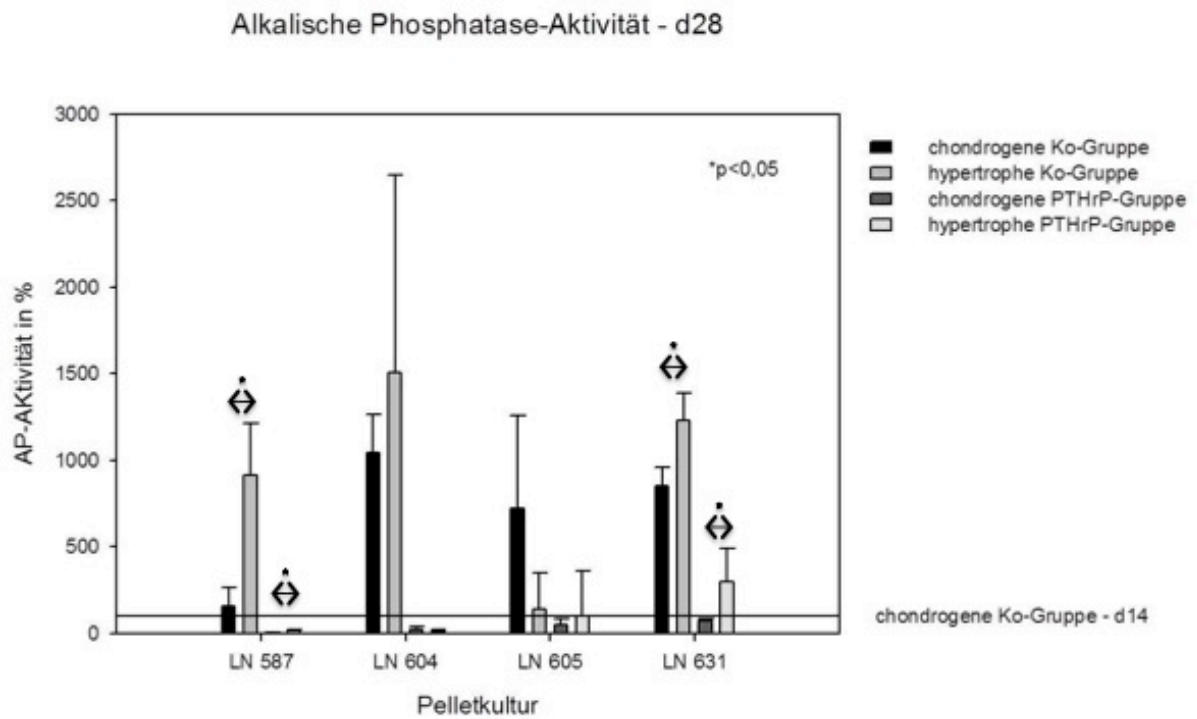


ABBILDUNG 12: ALKALISCHE-PHOSPHATASE-AKTIVITÄT AN TAG 28 DER PELLETKULTUR NORMALISIERT ZUR CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 14, ANGEGBEN IN PROZENT MIT STANDARDABWEICHUNG; N=8; \*P<0,05

## HISTOLOGIE

Für die histologische Auswertung wurden an Tag 1, 14 und 28 jeweils zwei Konstrukte entnommen, halbiert und entsprechend gefärbt. War eine Pelletkultur angelegt worden, wurde diese ebenfalls an Tag 28 ausgewertet.

Wesentlich bei der Auswertung war, dass die Differenzierung bei allen Experimenten vor allem im Randbereich der Matrices stattgefunden hatte (Abb. 13). Bei den sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils unterschiedlichen Spenderzellen konnte dies bei allen vier Bedingungen beobachtet werden.

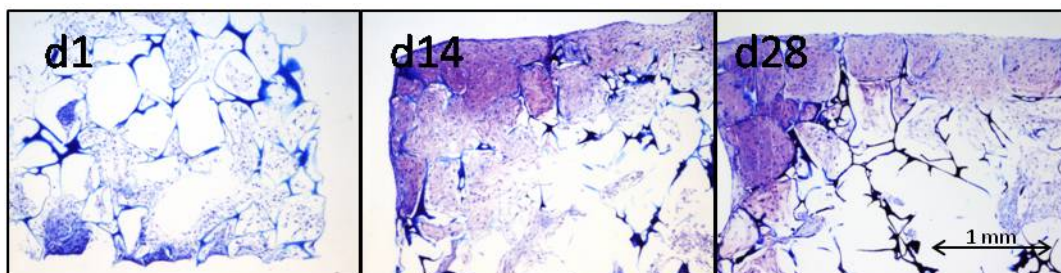


ABBILDUNG 13: MATRIX DER CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 1, 14 UND 28, DMMB-FÄRBUNG; N=4

## DIMETHYLMETHYLENBLAU

Mit Hilfe der Dimethylmethylenblau-Färbung konnte bereits an Tag 14 eine Differenzierung in den Randbereichen der Matrix in beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 14).

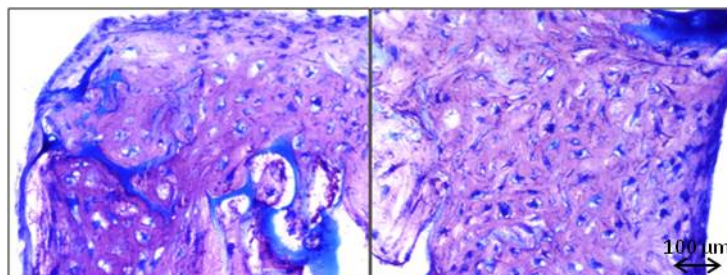


ABBILDUNG 14: MATRIX DER CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE (LINKS) UND CHONDROGENEN PTHrP-VERGLEICHSGRUPPE (RECHTS) AN TAG 14, DMMB-FÄRBUNG; N=4

Jedoch war kein Unterschied in der Anfärbung zwischen der chondrogenen Kontroll- und der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe an Tag 14 zu erkennen. Ebenfalls war kein Unterschied im Differenzierungsgrad bezüglich Zellgröße oder -dichte feststellbar.

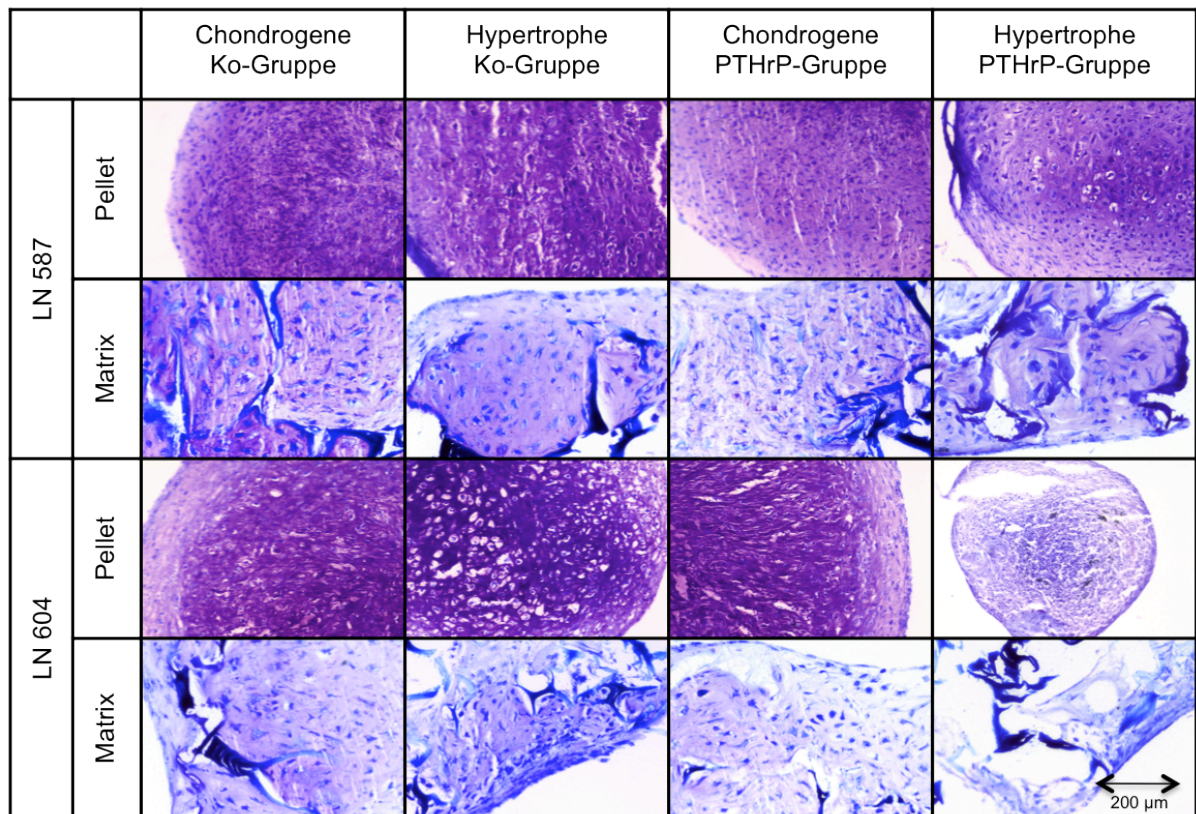


ABBILDUNG 15: MATRIZES UND PELLETS AN TAG 28 AM BEISPIEL LN 587 UND LN 604, DMMB-FÄRBUNG, 10X VERGRÖßERT, N=4

An Tag 28 war eine im Vergleich zu Tag 14 ausgeprägtere Differenzierung vor allem im Randbereich der Matrizes zu finden. In der Pelletkultur zeigte sich eine vermehrte Größenzunahme der Zellen und positive Anfärbung in der hypertrophen Kontrollgruppe im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe. Zwischen der chondrogenen Kontrollgruppe und der PTHrP-Vergleichsgruppe ließen sich keine wesentlichen histologischen Unterschiede in der Pelletkultur feststellen. Die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe wies dagegen einen allgemein schlechteren Differenzierungsgrad auf, da die Pellets im Vergleich kleiner waren und sich die Zellen auch etwas weniger anfärben ließen. Es waren ebenfalls keine Unterschiede feststellbar zwischen der chondrogenen Kontrollgruppe der Pelletkultur gegenüber der chondrogenen Kontrollgruppe der Matrixkultur. Allerdings ließ sich im Gegensatz zum Pelletsystem die Größenzunahme der hypertrophen Kontrollgruppe im Matrixsystem nicht nachweisen. Hier war kein wesentlicher histologischer Unterschied zur chondrogenen Kontrollgruppe des Matrixsystems feststellbar, wie auch nicht zwischen der chondrogenen Kontrollgruppe gegenüber der chondrogenen

PTHrP-Vergleichsgruppe und der hypertrophen Kontrollgruppe gegenüber der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe des Matrixsystems (Abb. 15).

#### ALKALISCHE PHOSPHATASE

In der Pelletkultur zeigte sich eine vermehrte positive Anfärbung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität in der hypertrophen Kontrollgruppe im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe, während kein Unterschied zwischen der chondrogenen Kontrollgruppe und der PTHrP-Vergleichsgruppe feststellbar war. Dagegen waren jedoch die Pellets der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe deutlich weniger angefärbt und kleiner, sodass sich schlussfolgern lässt, dass sie dedifferenziert sind (Abb. 16).

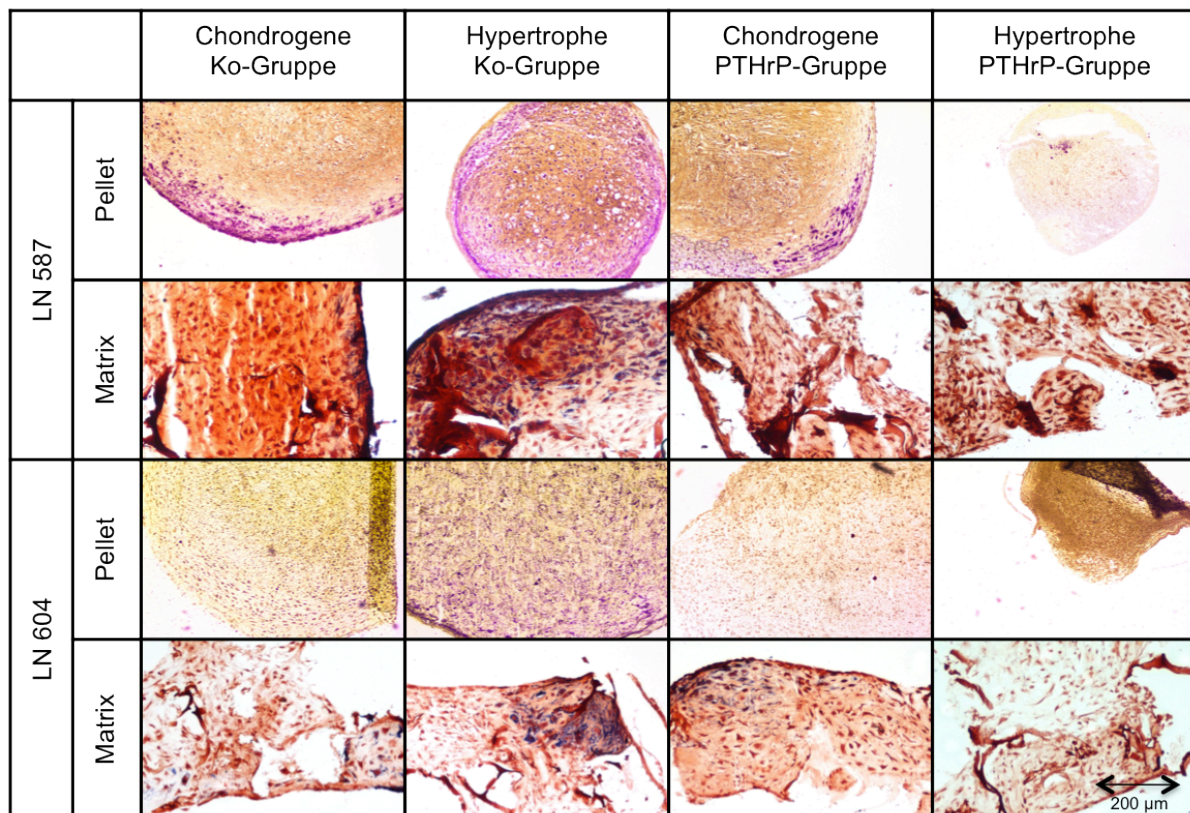


ABBILDUNG 16: MATRIZES UND PELLETS AN TAG 28 AM BEISPIEL LN 587 UND LN 604, ALKALISCHE-PHOSPHATASE-FÄRBUNG, 10X VERGRÖßERT; N=4

Das histologische Bild der chondrogenen Kontrollgruppen und chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppen beider Kultursysteme war wiederum gleich, während sich in der hypertrophen Kontrollgruppe des Matrixsystems ebenfalls eine stärkere positive Anfärbung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität im direkten Vergleich zur chondrogenen Kontrolle des Matrixsystems zeigte. Minimal stärkere positive

Anfärbung ließ sich ebenfalls bei zwei von vier Versuchen für die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe feststellen im Vergleich zur chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe, jedoch im geringeren Ausmaß als bei der Kontrollgruppe (Abb. 16).

## IMMUNHISTOLOGIE

### KOLLAGEN-II

Kollagen-II lässt sich im differenzierten Knorpel nachweisen (Abb. 17). Dies gelang bereits an Tag 14 in kleinen Arealen der Matrices.

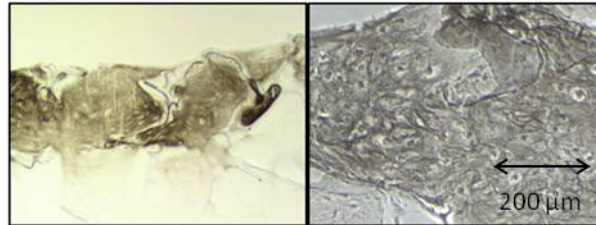


ABBILDUNG 17: MATRIX DER CHONDROGENEN KONTROLLGRUPPE AN TAG 14 ALS ÜBERSICHT (LINKS) UND DETAILS (RECHTS), KOLLAGEN-II-FÄRBUNG; N=4

Positiv ließen sich die Proben aller Bedingungen, sowohl im Matrix- wie auch im Pelletsystem anfärben. Im Pelletsystem zeigte die Kollagen-II-Färbung wieder eine Größenzunahme der Zellen in der hypertrophen Kontrollgruppe gegenüber der chondrogenen Kontrollgruppe. Die chondrogene Kontrollgruppe und die PTHrP-Vergleichsgruppe wiesen ein ähnliches histologisches Bild auf. Die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe zeigte bei zwei von vier Versuchen eine Größenzunahme der Zellen im Vergleich zur chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe im Pelletsystem, jedoch war dieser Unterschied geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied der Zellgröße war im Matrixsystem beim Vergleich von chondrogener zur hypertrophen Gruppe nicht nachweisbar. Das histologische Bild der Matrices aller vier Bedingungen war ähnlich. Es fanden sich keine Unterschiede beim direkten Vergleich der chondrogenen Kontrolle mit der hypertrophen Kontrolle, sowie der chondrogenen Kontrollgruppe mit der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe. Die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe wies im Vergleich mit allen anderen Gruppen den geringsten Differenzierungsgrad bis hin zur vermutlichen Dedifferenzierung wie im Beispiel des Spenders LN 604 (Abb. 18).

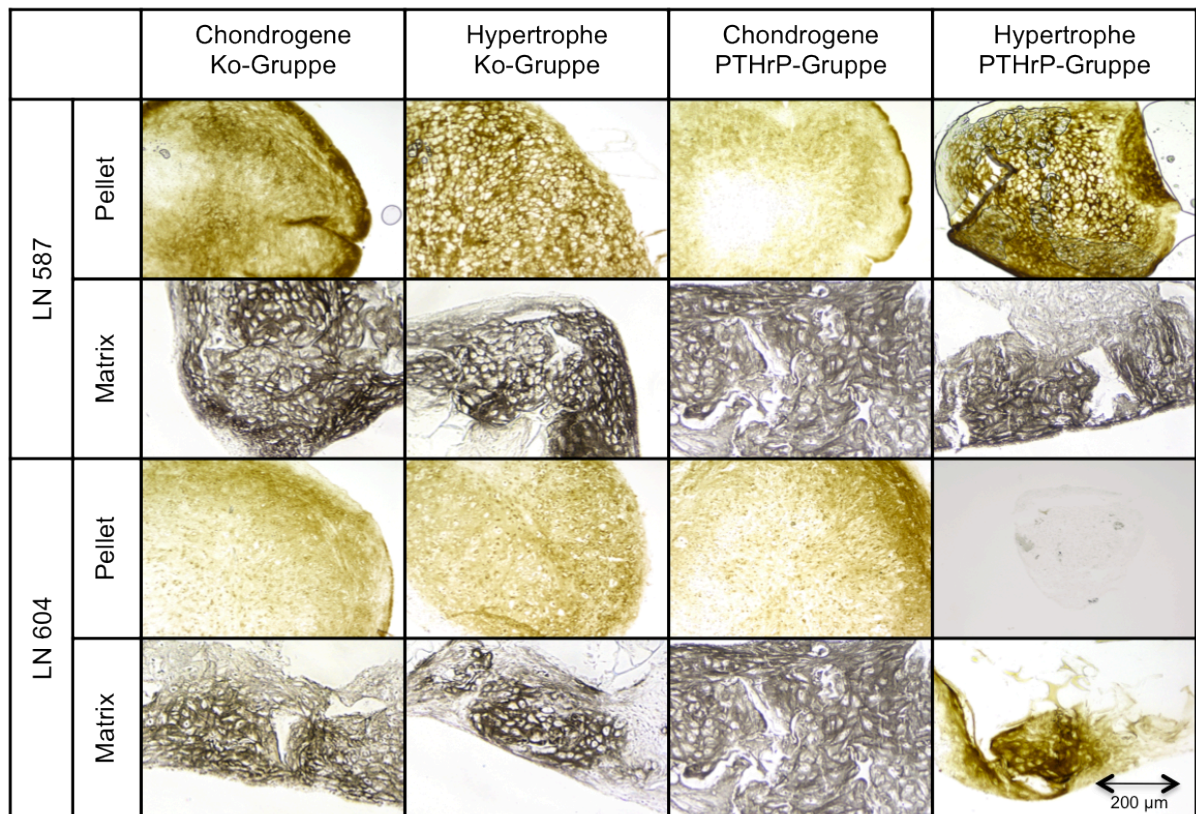


ABBILDUNG 18: MATRIZES UND PELLETS AN TAG 28 AM BEISPIEL LN 587 UND LN 604, KOLLAGEN-II-FÄRBUNG, 10X VERGRÖßERT; N=4

#### KOLLAGEN-X

Kollagen-X ließ sich vor allem in der hypertrophen Kontrollgruppe und der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe im Pelletsystem positiv nachweisen, die Pellets der chondrogenen Kontrollgruppe und chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe wurden bei drei von vier Experimenten nicht angefärbt. Im Matrixsystem ließen sich dagegen nur bei zwei von vier Experimenten die hypertrophen Kontrollgruppen anfärben. Ebenso waren bei zwei von vier die chondrogenen Kontrollgruppen Kollagen-X positiv. Die PTHrP-Vergleichsgruppen ließen sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht anfärben, sowohl unter chondrogenen wie auch hypertrophen Bedingungen (Abb.19).

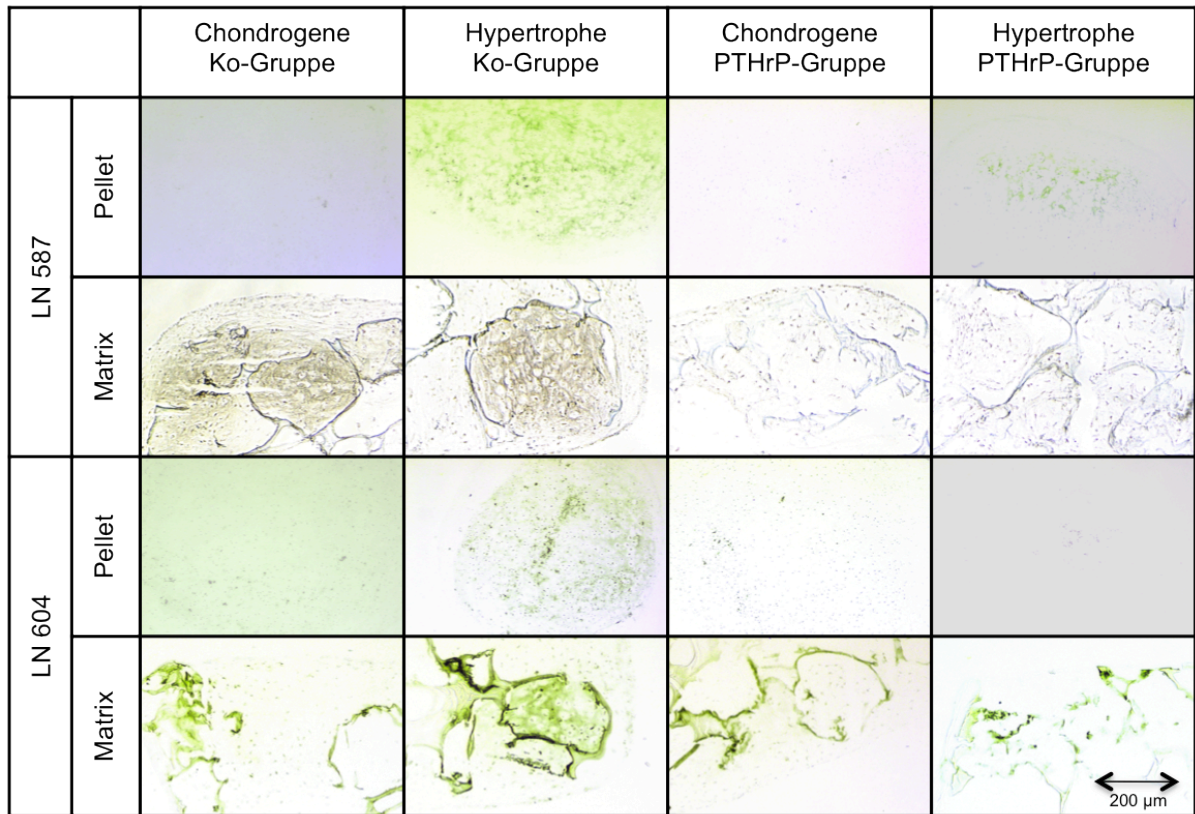


ABBILDUNG 19: MATRIZES UND PELLETS AN TAG 28 AM BEISPIEL LN 587 UND LN 604, KOLLAGEN-X-FÄRBUNG, 10X VERGRÖßERT; N=4

## DISKUSSION

### HYPERTROPHIEINDUKTION IM MATRIXSYSTEM

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen in *in vitro*-Kulturmodellen einen ähnlichen Differenzierungsvorgang wie die Chondrozyten der Wachstumsfuge durchlaufen (53). Durch Zugabe von Dexamethason und TGF- $\beta$  zum Medium kann bei mesenchymalen Stammzellen Chondrogenese *in vitro* induziert werden, jedoch kommt es während der Differenzierung auch stets zur Ausbildung von Hypertrophiemerkmalen. Eine Steigerung der Ausprägung der Hypertrophiemerkmale erreicht man, wenn dem Medium Dexamethason und TGF- $\beta$  entzogen und stattdessen Trijodthyronin zugegeben wird. Dies wurde im Pelletmodell etabliert und konnte nun auf ein Matrixsystem übertragen werden (2, 30, 50, 53, 55, 60, 71).

Die größeren Matrices bieten im Gegensatz zu den Pellets den Vorteil, dass sie sich besser *in vivo* applizieren lassen und somit eine relevantere Option bezüglich der Therapie von Gelenkknorpeldefekten darstellen.

Bleibt nun die Frage, inwieweit die Matrix die Chondrogenese und Hypertrophieinduktion beeinflussen kann. Versuche haben gezeigt, dass Chondrogenese im Pelletsystem induzierbar ist. Pelletsysteme zeigen im Vergleich zum Matrixsystem eine höhere Zelldichte und somit mehr Zell-Zell-Kontakte, die wiederum eine entscheidende Rolle in der Chondrogenese spielen. Die Kondensation der Progenitorzellen und die Induktion der Chondrogenese in der Wachstumsfuge werden unter anderem positiv durch N-Cadherin beeinflusst (90). Wenn man annimmt, dass bei einer Abnahme der Zelldichte es zu einem geringeren Ausmaß an Zell-Zell-Kontakten kommen könnte, könnte man daraus folgern, dass die Chondrogenese eventuell verhindert oder zumindest vermindert werden könnte. Im matrixbasierten Kultursystem findet man eine geringere Zelldichte. Jedoch hat dieser Versuch gezeigt, dass es trotz dieser verminderten Zelldichte zu keiner Einschränkung der Chondrogenese gekommen ist, nachgewiesen vor allem durch histologische Methoden. Die extrazelluläre Matrix des Knorpels zeichnet sich in ihrer Struktur durch einen hohen Anteil an Glykosaminoglykanen und Kollagen-II aus, produziert wird sie im Knorpelgewebe von reifen Chondrozyten (21, 45, 60, 63, 79).

Da mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, zu einem chondrogenen Phänotyp zu differenzieren, wird von ihnen ebenfalls eine ähnliche extrazelluläre Matrix gebildet, die sich wiederum histochemisch anfärben lässt. Sowohl im Matrix- wie auch im Pelletsystem konnte in diesem Versuch das Vorhandensein von Glykosaminoglykanen und Kollagen-II durch entsprechende Färbungen in der chondrogenen Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 15 und Abb. 18). Jedoch bestand kein wesentlicher Unterschied im histologischen Bild im Vergleich beider Kultursysteme. Daraus lässt sich folgern, dass die verminderte Zell-Dichte, und damit die geringere Anzahl an Zell-Zell-Kontakten im Matrixsystem keinen Einfluss auf die Ausprägung der Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen hatte und sie zu einem ähnlichen Phänotyp, wie im Pelletsystem differenzieren konnten.

Histologisch charakteristische Marker für einen hypertrophen Knorpel sind unter anderem eine Zellgrößenzunahme, da die Zellorganellen anschwellen, sowie eine vermehrte Alkalische-Phosphatase-Aktivität und eine Kollagen-X-Expression (3, 51, 71). Im Pelletsystem induzierte das hypertrophe Medium eine Zunahme der Zellgröße, sowie eine vermehrte Expression von Kollagen-X und Alkalischer-Phosphatase-Aktivität (Abb. 15, 16 und 19). Im Matrixsystem dagegen wurde durch das hypertrophe Medium keine wesentliche Zunahme der Zellgröße oder Steigerung der Kollagen-X-Expression erwirkt, wenn auch Kollagen-X histologisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 15 und 19). Jedoch kam es zu einer vermehrten Anfärbung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität (Abb. 16). Die nasschemische Analyse wies in beiden Kulturmodellen einen deutlichen Anstieg der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität in der hypertrophen Gruppe gegenüber der chondrogenen Gruppe nach (Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12). Im Pelletsystem kam es in drei von vier Experimenten zu einer signifikanten Steigerung. Im Matrixsystem waren an Tag 21 drei und an Tag 28 zwei von sechs Experimenten signifikant verändert. Das Verhältnis von Glykosaminoglykanen zu DNA, das ebenfalls zur Indikation von Hypertrophieausprägung verwendet werden kann, zeigte in einem von sechs Experimenten eine signifikante Reduktion des Wertes und in allen Anderen ebenfalls einen geringeren Wert in der hypertrophen Gruppe im Vergleich zur chondrogenen Gruppe (Abb. 7 und Abb. 8). Dies entspricht vorangegangenen Versuchen, in denen Hypertrophie im Pelletsystem induziert werden konnte, bestätigt durch eine

histologisch gesicherte Zellgrößenzunahme, Kollagen-X-Expression und gesteigerte Alkalische-Phosphatase-Aktivität (71, 72). Schlussendlich kann man folgern, dass es auch im Matrixsystem zur Ausprägung eines hypertrophen Phänotyps gekommen ist, wenngleich die Veränderungen der Zellmorphologie und der Kollagen-X-Expression im Gegensatz zur Aggregatkultur nicht nachgewiesen werden konnte. Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität war gegenüber der chondrogenen Kontrollgruppe histologisch verstärkt und biochemisch gesteigert.

#### AUSWIRKUNG VON PTHrP

Eine weitere Fragestellung dieses Versuches war der Einfluss des PTHrP auf die Ausprägung der Hypertrophie. PTHrP ist ein Protein, das während der Fetalzeit perichondralen Zellen und periartikulären Chondrozyten sezernieren und dessen Hauptaufgabe es ist, den Pool der proliferierenden Chondrozyten zu erhalten. Zusammen mit Ihh bildet PTHrP einen Rückkopplungsmechanismus, durch den die individuelle Knochenlänge festgelegt wird. Es agiert über den gleichen G-Proteingekoppelten Rezeptor wie Parathormon, den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1 (PPR), der auch postnatal von proliferierenden Chondrozyten in geringem und von prähypertrophen Chondrozyten in hohem Maße exprimiert wird (53, 92, 114). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über den PTHrP/Ihh-Rückkopplungsprozess jedoch beziehen sich weitgehend auf die Fetalzeit. Postnatal verändert sich die Organisation der Epiphysenfuge entscheidend. Es bildet sich ein zusätzlicher Knochenkern, der nun die Wachstumsfuge von der Gelenkfläche trennt (22). Eine Untersuchung von 7 Tage alten Ratten unterstrich aber bereits die Vermutung, dass der Rückkopplungsprozess postnatal eventuell fortbesteht und sich der PTHrP-Sekretionsort von periartikulär nur näher an die Wachstumsfuge verlagert (22, 62, 110). Ihh scheint postnatal weiterhin eine bedeutende Rolle zu spielen, da ein Mangel an Ihh zu einer vorzeitigen Vaskularisierung und Ossifikation, dem Verschluss der Epiphysenfuge führt (62). Nebenbei beeinflussen weitere endokrine Faktoren die enchondralen Ossifikationsvorgänge, insbesondere die knochenmorphogentische Proteine (BMP) der TGF- $\beta$ -Superfamilie (32). BMP steht in direkter Interaktion mit der PTHrP/Ihh-Schleife. Ihh und BMP wirken in einem gegenseitig positivem Rückkopplungsprozess, jedoch parallel und unabhängig voneinander auf die Sekretion PTHrP (68, 83, 95, 117). TGF- $\beta$  wird ebenfalls in hohem Maße in der

Wachstumsfuge exprimiert, nimmt *in vitro* Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und stimulierte in Experimenten die Induktion von PTHrP bei periartikulären Zellen (34, 77, 81, 81, 104). Gerade für die therapeutisch sinnvolle Implantation von Zellmaterial bei Gelenkdefekten ist es wünschenswert, die Hypertrophie Merkmale möglichst auszuschalten. Dementsprechend stellt sich die Frage nach einem Faktor wie PTHrP, der in der menschlichen Wachstumsfuge die Proliferation von Chondrozyten stimuliert und die Hypertrophieinduktion verzögert, um die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps zu verhindern.

Ebenfalls zeigten laboreigene Vorversuche, dass PTHrP bis zu einer Konzentration von 100 pM im chondrogenen Medium einer hMSC-Pelletkultur die Chondrogenese nicht wesentlich inhibiert. Ab einer Konzentration von 1000 pM dagegen wurde eine Abnahme der Chondrogenese beobachtet. Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität wurde durch PTHrP-Zugabe dosisabhängig kontinuierlich bis zu einer Konzentration von 1000 pM PTHrP im Medium deutlich reduziert. Im hypertrophen Medium dagegen fand sich keine dosisabhängige Reduktion der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität und die Zunahme der Zellgröße konnte nicht inhibiert werden. Folglich liegt die Konzentration für die therapeutisch sinnvolle Anwendung von PTHrP im Bereich von 100 pM, da die Chondrogenese noch nicht wesentlich gehemmt, jedoch bereits die Alkalischen-Phosphatase-Aktivität reduziert wurde. Um dies nun ebenfalls für ein Matrixsystem zu etablieren, wurde für die PTHrP-Vergleichsgruppe in diesem Versuch PTHrP in einer Konzentration von 100 pM zum Medium zugesetzt, um die Hemmschwelle nicht zu überschreiten.

Unter chondrogenen Bedingungen konnten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Glykosaminoglykangehaltes zwischen der Kontrollgruppe und der PTHrP-Vergleichsgruppe festgestellt werden (Abb.6 und 8). Dies spricht dafür, dass PTHrP die Chondrogenese nicht gehemmt hat. Zudem konnte einerseits eine Reduktion der biochemisch bestimmten Alkalischen-Phosphatase-Aktivität im Medium der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe im Vergleich zur chondrogenen Kontrolle signifikant festgestellt werden (Abb. 10 und Abb. 11), während sich histologisch jedoch kein Unterschied bezüglich Morphologie oder Anfärbung zeigte (Abb. 14). Der Vergleich der hypertrophen Kontroll- zur hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe dagegen zeigte eine signifikante Reduktion der Alkalische-

Phosphatase-Aktivität im Medium in fünf von sechs Experimenten im Matrixsystem (Abb. 10 und Abb. 11). In der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe fand sich ebenso wie oben schon für die Kontrolle beschrieben, keine ausschlaggebende Zellgrößenzunahme oder Anfärbung durch Kollagen-X (Abb. 19). Aber es fiel allgemein auf, dass die hypertrophen Matrices der PTHrP-Vergleichsgruppe nach 28 Tagen am wenigsten von allen vier Bedingungen mit differenzierten Zellen besiedelt waren.

Die verminderte Alkalische-Phosphatase-Aktivität der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe kann nun einerseits durch eine im Vergleich zur Kontrolle geringere Hypertrophieausprägung bedingt sein, oder durch eine Dedifferenzierung der Zellen. Auf Grund der histologischen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass man eher von einer Dedifferenzierung der Zellen in der hypertrophen PTHrP-Vergleichsgruppe ausgehen kann. Mit dem Wechsel vom chondrogenen zum hypertrophen Medium an Tag 14 fallen die chondrogenen Stimuli weg. Zellen, die bis zum Tag 14 ausreichend chondrogen differenziert sind, können nun unter dem Einfluss des hypertrophen Mediums hypertrophieren (siehe Kontrollgruppe). Die Zellen jedoch, die an Tag 14 noch nicht weit genug differenziert sind, neigen zur Dedifferenzierung. Man kann vielleicht vermuten, dass unter dem Einfluss von PTHrP in der Matrixkultur die Zellen der PTHrP-Vergleichsgruppe an Tag 14 nicht restlos differenziert waren und somit nach der Umstellung auf das hypertrophe Medium eine Dedifferenzierung zu beobachten ist.

#### PROBLEME DES MATRIXMODELLS

Das wesentliche Problem der Besiedelung der Matrix zeichnete sich bereits ab Tag 14 ab, nämlich dass die Zellen vorwiegend in der Peripherie differenzierten. Die Randbereiche waren dicht besiedelt, während im Zentrum lediglich undifferenzierte Zellen oder bereits abgebaute Matrix zu finden war, wie sich mikroskopisch feststellen ließ. Anhand der Bestimmung des DNA-Gehaltes sah man, dass dieser über den Verlauf der 28-tägigen Kulturdauer unstat war und weder signifikant ab- noch zunahm. Unterscheiden kann man anhand dieses Ergebnisses jedoch nicht, ob es sich vorwiegend um die DNA noch lebender oder bereits toter Zellen handelte. Schwierig blieb bis zuletzt die homogene Besiedelung an Tag 1. Dies wurde durch

eine modifizierte Pipettenspitzen und mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren erreicht, sodass auf den histologischen Bildern von Tag 1 eine durchaus homogene Besiedelung erreicht werden konnte. Jedoch differenzierten die zentrumsnahen Zellen nicht in gleicher Weise, wie die Zellen der Peripherie, was an der Größe der Matrizes gelegen sein mochte.

Zur Optimierung der Ernährung von TE-Konstrukten werden bereits sogenannte Perfusions Bioreaktor Systeme eingesetzt, im Moment vorwiegend bei Osteoblasten- und Leberzellkulturen. Durch physikalische und mechanische Reizung wird versucht, neben der Stimulaton durch bioaktive Substanzen, eine positive Wirkung auf die Differenzierung- und Proliferationsvorgänge der Zellen zu nehmen (26, 41, 52, 105).

## ZUSAMMENFASSUNG

Tissue Engineering bietet Therapieoptionen wie die autologe Chondrozytentransplantation, verknüpft mit dem Nachteil, dass bei der Zellentnahme gesundes Gewebe verletzt wird (Donormorbidität). Einfacher lassen sich humane mesenchymale Stammzellen aus dem Beckenkamm gewinnen, *in vitro* proliferieren und zu reifen Chondrozyten differenzieren (11, 50, 80, 89, 93, 102, 112). *In vitro* aber exprimierten chondrogen vordifferenzierter MSCs Hypertrophiemarker, *in vivo* kalzifizierten und vaskularisierten die ektop implantierte Pellets (85). Es stellt sich die Frage nach einem stabilen chondrogenem Phänotyp in einem eventuell praxisrelevanteren Kultursystem unter Beherrschung der Hypertrophie.

In diesem Versuch wurden humane mesenchymale Stammzellen in einer Matrixkultur mit TGF- $\beta$  und Dexamethason chondrogen vordifferenziert. An Tag 14 ersetzte Triiodthyronin zur Hypertrophieinduktion diese chondrogenen Stimuli für weitere 14 Ta-ge. In der hypertrophen Gruppe nahm der Glykosaminoglykgehalt ab und stieg die Alkalischen-Phosphatase-Aktivität bereits an Tag 21 stärker an als in der chondrogenen Kontrolle. Histologisch waren die Zellen im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht vergrößert und fast negativ für Kollagen-X. Als möglicher Hemmfaktor der Hypertrophie fungierte PTHrP, das laut Vorversuchen in einer Konzentration von 100 pM die Chondrogenese nicht hemmt. Tatsächlich unterschieden sich die chondrogene Kontroll- und chondrogene PTHrP-Vergleichsgruppe histologisch nicht. Biochemisch war die Alkalische-Phosphatase-Aktivität der chondrogenen PTHrP-Vergleichsgruppe zur Kontrolle signifikant verringert. Die hypertrophe PTHrP-Vergleichsgruppe wies sowohl eine reduzierte Alkalische-Phosphatase-Aktivität als auch ein histologisch dedifferenziertes Zellbild auf, vermutlich auf Grund einer mangelhafteren chondrogenen Vordifferenzierung. In der Matrixkultur gelang es somit, humane mesenchymale Stammzellen zu einem chondrogenem Phänotyp zu differenzieren, um anschließend Hypertrophie zu induzieren, sodass es zu einer Abnahme des Glykosaminoglykgehaltes und zu signifikanten Anstiegen der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität kam. In einer PTHrP-Vergleichsgruppe war diese wiederum signifikant verringert. Um die erlangten Erkenntnisse zu erweitern, sollte das etablierte Modell nun auf einen *in vivo* Versuch zu übertragen.

## ABKÜRZUNGEN

AP	-	Alkalische Phosphatase
BMP	-	Bone morphogenetic protein
BSA	-	Bovines Serum Albumin
DAB	-	Diaminobenzidin
DMEM	-	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMMB	-	Dimethylmethylenblau
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	-	Fibroblast-Growth-Factor
GAG	-	Glykosamnioglykan
IGF-1	-	Insulin-like-Groth-Factor-1
ITS-3	-	Insulin-Transferrin-Sodium-3
Ihh	-	Indian Hedgehog
HCL	-	Chlorwasserstoff
MMP-13	-	Matrix-Metallopeptidase-13
MSC-Medium	-	serumhaltiges Medium für mesenchymale Stammzellen
N-CAM	-	neuronal Cell Adhesion Molecule
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzsäure
PTHrP	-	Parathormon-related-Peptid
s.o.	-	siehe oben
SCID	-	severe combined Immunodeficiency
TE-Puffer	-	Tris-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	-	Transforming-Growth-Factor- $\beta$
Tris	-	Trishydroxymethylaminomethan
T <sub>3</sub>	-	Triiodthyronin
U/min	-	Umdrehungen pro Minute
VEGF	-	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF	-	Nerve Growth Factor

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Alman BA. Skeletal dysplasias and the growth plate. *Clin Genet* 73:24-30, 2008.
2. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. TGF- $\beta$ 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol*;158:414–29, 1993.
3. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*; 268:189-200, 2001.
4. Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, et al. Fresh osseochondral allografts for post-traumatic defects in the knee: A survivorship analysis. *J Bone Joint Surg* 74B:105–110, 1992.
5. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*; 30:215–224, 1982.
6. Bernardo BC, Belluoccio D, Rowley L, Little CB, Hansen U, Bateman JF. Cartilage intermediate layer protein 2 (CILP-2) is expressed in articular and meniscal cartilage and down-regulated in experimental osteoarthritis. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28;286(43):37758-67. Epub 2011 Aug 31.
7. Bobic V: Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 3:262–264, 1996.
8. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop* (367 Suppl):S147–S155, 1999.
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med* 331:889–895, 1994.
10. Brooks PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications, *Curr Opin. Rheumatol.* 14, pp. 573–577, 2002.
11. Buckwalter JA. Articular cartilage injury. *Clin Orthop Relat Res*. Sep;(402):21-37, 2000.
12. Buckwalter JA, Lappin DR. The disproportionate impact of chronic arthralgia and arthritis among women. *Clin. Orthop.* 372, pp. 159–168, 2000.
13. Buckwalter JA, Lohmander S: Operative treatment of osteoarthrosis: Current practice and future development. *J Bone Joint Surg* 76A:1405–1418, 1994.
14. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage II. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J. Bone Jt. Surg.* 79A, pp. 612–632, 1997.
15. Buckwalter JA, Martin JA, Degenerative Joint Disease. *Clinical Symposia*, Ciba Geigy, Summit NJ, pp. 2–32, 1995.
16. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* May 20; 58(2):150-67, 2006. Epub 2006 Mar 13
17. Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD. Perspective on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology*; 43(3-4):603-9, 2006.

18. Buckwalter JA, Martin JA, Mankin HJ. Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* 49, pp. 481–489, 2000.
19. Buckwalter JA, Woo SL-Y, Goldberg VM, et al: Soft tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg* 75A:1533–1548, 1993.
20. Campanacci M, Cervellati C, Donati U: Autogenous patella as replacement for a resected femoral or tibial condyle: A report on 19 cases. *J Bone Joint Surg* 67B:557–563, 1985.
21. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick, G et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*; 56:289–301, 1980.
22. Chau M, Forcinito P, Andrade AC, Hegde A, Ahn S, Lui JC, Baron J, Nilsson O. Organization of the Indian hedgehog--parathyroid hormone-related protein system in the postnatal growth plate. *J Mol Endocrinol.* 2011;47(1):99-107.
23. Chen J, Wang, C, Lu S, Wu J, Guo X, Duan C, Dong L, Song Y, Zhang J, Jing D, Wu L, Ding J, Li D. In vivo chondrogenesis of adult bonemarrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319, 429–438, 2005.
24. Chow G, Knudson CB, Knudson W. Expression and cellular localization of human hyaluronidase-2 in articular chondrocytes and cultured cell lines. *Osteoarthritis Cartilage*; 14(9):849–858, 2006.
25. Convery FR, Meyers MH, Akeson WH: Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop* 273:139–145, 1991.
26. David B, Bonnefont-Rousselot D, Oudina K, Degat MC, Deschepper M, Viateau V, Bensidhoum M, Oddou C, Petite H. A Perfusion Bioreactor for Engineering Bone Constructs: An In Vitro and In Vivo Study. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Feb 17.
27. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten F. Failure of In Vitro–Differentiated Mesenchymal Stem Cells From the Synovial Membrane to Form Ectopic Stable Cartilage In Vivo. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 50, No. 1, January 2004, pp 142–150 DOI 10.1002/art.11450 © 2004, American College of Rheumatology.
28. De Lise AM, Tuan RS. Alterations in the spatiotemporal expression pattern and function of N-cadherin inhibit cellular condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2002;87(3):342-59
29. Delise AM, Tuan RS. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn.* 2002 Oct;225(2):195-204.
30. Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem cells* 24, 1487–1495, 2006.
31. Elford PR, Graeber M, Ohtsu H, Aeberhard M, Legendre B, Wishart WL, MacKenzie AR. Induction of swelling, synovial hyperplasia and cartilage proteoglycan loss upon intra-articular injection of transforming growth factor beta-2 in the rabbit. *Cytokine.* 1992 May;4(3):232-8.
32. Emans PJ, Spaapen F, Surtel DA, Reilly KM, Cremers A, van Rhijn LW, Bulstra SK, Voncken JW, Kuijjer R. A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1alpha activation and BMP expression. *Bone.* 2007 Feb;40(2):409-18. Epub 2006 Sep 18.

33. Flynn JM, Springfield DS, Mankin HJ. Osteoarticular allografts to treat distal femoral osteonecrosis. *Clin Orthop* 303:38–43, 1994.
34. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Smad 2 and 3 mediate TGF- $\beta$ 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 141:4728–4735. 2000.
35. Garrett JC. Fresh osteochondral allografts for treatment of articular defects in osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop* 303:33–37, 1994.
36. Gelse K, Ekici AB, Cipa F, Swoboda B, Carl HD, Olk A, Hennig FF, Klinger P. Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage - clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Feb;20(2):162-71. Epub 2011 Dec 13.
37. Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Oct;20(5):1003-25.
38. Griffin TM, Guilak F. The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis. *Exerc Sport Sci Rev*; 33(4):195–200, 2005.
39. Grigolo B, Roseti L, De Franceschi L, et al. Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation. *J Bone Joint Surg Am*. 87(1):46–57, 2005.
40. Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg* Jan;18(1):35-53, 2001.
41. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Modulation of cell differentiation in bone tissue engineering constructs cultured in a bioreactor. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:225-41.
42. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am*. 85-A(2):185–192, 2003.
43. Hunziker EB. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9:22–32, 2001.
44. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial thickness defects in articular cartilage: Cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 78A:721–733, 1996.
45. Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J. Bone Joint Surg. Br*. 83, 289–294, 2001.
46. Iwamoto M, Higuchi Y, Enomoto-Iwamoto M, Kurisu K, Koyama E, Yeh H, Rosenbloom J, Pacifici M. The role of ERG (ets related gene) in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. 9 Suppl A:S41-7, 2001.
47. Janune D, Kubota S, Nishida T, Kawaki H, Perbal B, Iida S, Takigawa M. Novel effects of CCN3 that may direct the differentiation of chondrocytes. *FEBS Lett*. 2011 Oct 3;585(19):3033-40.
48. Jiang X, Cui PC, Chen WX, Zhang ZP. In vivo chondrogenesis of induced human marrow mesenchymal stem cells in nude mice. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23, 766–769, 773, 2003.

49. Johnson LL: Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin. Orthop. Relat. Res*; Oct;(391 Suppl.):S306-317, 2001.
50. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*; 238:265–272, 1998.
51. Kayakabe M, Tsutsumi S, Watanabe H, Kato Y, Takagishi K. Transplantation of autologous rabbit BM-derived mesenchymal stromal cells embedded in hyaluronic acid gel sponge into osteochondral defects of the knee. *Cytotherapy*; 8:343-53, 2006.
52. Koch MA, Vrij EJ, Engel E, Planell JA, Lacroix D. Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Dec 15;95(4):1011-8. doi: 10.1002/jbm.a.32927. Epub 2010 Sep 24.
53. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423(6937):332–336, 2003.
54. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18, 64–73, 2006.
55. Leboy PS, Sullivan TA, Nooreyazdan M, Venezian RA. Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. *J Cell Biochem*; 66:394–403, 1997.
56. Leigh JP, Seavey W, Leistikow B. Estimating the costs of job related arthritis, *J. Rheumatol*; 28, pp. 1647–1654, 2001.
57. Levy AS, Lohnes J, Sculley S, LeCroy M, Garrett W. Chondral delamination of the knee in soccer players. *Am J Sports Med* 24:634–639, 1996.
58. Liu K, Zhou GD, Liu W, Zhang WJ, Cui L, Liu X, Liu TY, Cao Y. The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterials*. 2008 May;29(14):2183-92. Epub 2008 Mar 4.
59. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng.* 12, 3405–3416, 2006.
60. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415–28, 1998.
61. Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis, *Inflamm. Res.* 47, 90–100, 1998.
62. Maeda Y, Nakamura E, Nguyen MT, Suva LJ, Swain FL, Razzaque MS, Mackem S, Lanske B. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6382-7. Epub 2007 Apr 4.
63. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 37:129–140, 2000.
64. Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. The age-related decline in chondrocyte response to insulinlike growth factor-I: The role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 15:491–498, 1997.

65. Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res*; 21(1):139–148, 2003.
66. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 379–391, 2004.
67. Mello MA, Tuan RS. Effects of TGF- $\beta$ 1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells. *J Orthop Res*; 24:2095–105, 2006.
68. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001 Nov; 128(22):4523–34.
69. Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Sep; 87(9):1911–20.
70. Mollenhauer JA. Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. *Injury*; Apr; 39 Suppl 1:S5–12, 2008.
71. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*; 58:1377–88, 2008.
72. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Tuan RS, Angele P. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF- $\beta$  isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*. 2010; 192(3):158–66. Epub 2010 Apr 20.
73. Murphy G, Lee MH. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis Suppl*; 4:iv44–7, 2005.
74. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 3464–3474, 2003.
75. Mwale F, Girard-Lauriault PL, Wang HT, Lerouge S, Antoniou J, Wertheimer MR. Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings. *Tissue Eng*; 12:2639–47, 2006.
76. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res*; 24: 1791–8, 2006.
77. O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN. Effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 12:299–310. 1994.
78. Okubo Y, Reddi AH. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*; 306:186–90, 2003.

79. Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE. The use of lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg* 77A:65–72, 1995.
80. Paletta GA, Arnoczky SP, Warren RG. The repair of osteochondral defects using an exogenous fibrin clot: An experimental study in dogs. *Am J Sports Med* 20:725–731, 1992.
81. Pateder DB, Rosier RN, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, D'Souza M, O'Keefe RJ. PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res*. 2000 May 1;256(2):555-62.
82. Pateder DB, Ferguson CM, Ionescu AM, Schwarz EM, Rosier RN, Puzas JE, O'Keefe RJ. PTHrP expression in chick sternal chondrocytes is regulated by TGF-beta through Smad-mediated signaling. *J Cell Physiol*. 2001 Sep;188(3):343-51.
83. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A. Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol*. 1999 May 15;209(2):239-53.
84. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of MSC for chondrogenesis. *Injury*; Apr;39 Suppl 1:S58-65, 2008.
85. Pelttari K, Winter A, Steck E, 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*. 54(10):3254–3266, 2006.
86. Praemer AP, Furner S, Rice DP. *Musculoskeletal Conditions in the United States*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Illinois, p. 199, 1992.
87. Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B. Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium. *Endocrinology*;138:4966–76, 1997.
88. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23, 109–119, 2002.
89. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*;9:23-32; discussion 23-32, 2005.
90. Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis, *Rheumatology (Oxford)* 41 (Supp 1), pp. 3–6, 2002.
91. Roffman M. Autogenous grafting for an osteochondral fracture of the femoral condyle: A case report. *Acta Orthop Scand* 66:571–572, 1995.
92. Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, Pirro A, Kronenberg HM, Jüppner H. Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13689-94.
93. Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*;36:539-68, 2007.

94. Schumann D. Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur von osteochondralen Defekten. Dissertation, universität Regensburg; 2004.
95. Seki K, Hata A. Indian hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):18544-9. Epub 2004 Feb 23.
96. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4397-402.
97. Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, Atasoy E. Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. *J Hand Surg [Am]*; Nov; 9(6):880-6, 1984.
98. Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ*. 2007 Aug;49(6):449-54.
99. Simon LS, Osteoarthritis: a review, *Clin. Cornerstone* 2, pp. 26-37, 1999.
100. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury*. 2008 Apr;39 Suppl 1:S26-31.
101. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*. 1999 Aug 15;13(16):2072-86. Erratum in: *Genes Dev* 1999 Oct 1;13(19):2617.
102. Swieszkowski W, Tuan BH, Kurzydowski KJ, Hutmacher DW. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomol Eng*; 24:489-95, 2007.
103. Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytherapy*; 7:520-30, 2005.
104. Thorp B, Anderson I, Jakowlew S. Transforming growth factor- $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3, in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. *Development* 114:907-911. 1992.
105. Tiğli RS, Cannizaro C, Gümüşderelioğlu M, Kaplan DL. Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Jan;96(1):21-8. doi: 10.1002/jbm.a.32949. Epub 2010 Oct 14.
106. Tins BJ, McCall IW, Takahashi T, et al. Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology*. 234(2):501-508, 2005.
107. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41227-36. Epub 2003 Jul 31.
108. van den Berg WB, van Osch GJ, van der Kraan PM, van Beuningen HM. Cartilage destruction and osteophytes in instability-induced murine osteoarthritis: role of TGF beta in osteophyte formation? *Agents Actions*. 1993 Nov;40(3-4):215-9.
109. van der Eerden BC, Karperien M, Gevers EF, Löwik CW, Wit JM.

- Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *J Bone Miner Res.* 2000 Jun;15(6):1045-55.
110. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev.* 1998 Feb;71(1-2):65-76.
  111. Wagner, E. Non-surgical treatment of osteoarthritis of large joints - new aspects. *Wien Med Wochenschr*; 159(3-4):76-86, 2009.
  112. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 76A:579–592, 1994.
  113. Wang Y, Cheng Z, Elalieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD, Chang W. IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J Bone Miner Res.* 2011 Jul;26(7):1437-46. doi: 10.1002/jbmr.359.
  114. Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10240-5.
  115. Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S. The transplantation of an autogenic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. *Clin Orthop* 201:43–50, 1985.
  116. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*; 80:1745–57, 1998.
  117. Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2004 Sep 1;93(1):93-103.
  118. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7(2):211–228, 2001.

## LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Name	Eva Maria Teegen
Geburtsdatum	31.01.1985
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	ledig

### **Schulbildung**

08/1991 - 08/1995	Grundschule Königstein im Taunus
08/1995 - 07/2004	Gymnasium der Ursulinen, Straubing
01/2002 – 04/2002	Schüleraustausch am Orewa College, Auckland, Neuseeland
25.07.200	Abitur, Note 1,4

### **Hochschulausbildung**

10/2004 - 10/2005	Studium des Maschinenbaus, Technischen Universität München
10/2005 - 11/2011	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
19.09.2007	Physikum, Gesamtnote „befriedigend“
23.11.2011	2. Staatsexamen, Gesamtnote „gut“
2.12.2011	Approbation als Ärztin
04/2006 - 02/2007	Fernstudium des Bachelor of Laws, Fernuniversität Hagen

### **Berufserfahrung**

08/2010 - 7/2011	Praktisches Jahr bei Prof. Dr. Thapa, Surgery & Orthopaedic Department, Bir Hospital, Kathmandu, Nepal Mike Walsh, Trauma and Acute Clinical Academic Uni, Royal London Hospital, Großbritannien Prof. Dr. Salzberger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg Prof. Dr. Briner, Departement Medizin, Luzerner Kantonsspital, Schweiz Prof. Dr. Melter, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik St. Hedwig, Regensburg
04/2012 – 06/2012	Assistenzärztin in der Thoraxchirurgie bei Dr. med. Gunda Leschber, Evangelische Lungenklinik Berlin
seit 07/2012	Assistenzärztin in der Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie bei Prof. Dr. med. Peter Neuhaus, Charité Berlin

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Peter Angele danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation. Weiterhin danke ich Herrn Dr med. Michael Müller für die umfassende Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung bei Planung und Durchführung der Experimente und Auswertungen.

Zudem danke ich Herrn Dr. Richard Kujat für die Herstellung und Bereitstellung der Matrizes und der gesamten Arbeitsgruppe "Tissue Engineering" der Unfallchirurgie Regensburg für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Insbesondere danke ich auch Frau Daniela Drenkard für die rat- und tatkräftige Unterstützung im "Laboralltag", die mir mit Freude und Fürsorge bei Problemen stets zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter, die mir Studium und das Leben "nebenher" trotz aller Widrigkeiten finanzierte, sowie mich stets in all meinen Bestrebungen und Ideen positiv unterstützte. Ohne ihre Hilfe stünde ich heute nicht an dem Punkt, auf eine ausichtsreiche und vielversprechende Zukunft blicken zu dürfen.