

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:  
Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Frau Prof. Dr. Beisiegel

**PDGF-BB fördert die Redifferenzierung *in vitro*  
expandierter humaner Gelenkchondrozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nikolas Keilhack  
aus Hamburg

**Hamburg 2010**

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 07.12.2010.

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. P. Adamietz

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. T. Schinke

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung der Arbeit</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1	Aufbau und Struktur des Gelenkknorpels . . . . .	6
2.1.1	Kollagen . . . . .	7
2.1.2	Glykosaminoglykane und Proteoglykane . . . . .	8
2.2	Reparaturmechanismen . . . . .	9
2.3	Therapiekonzepte . . . . .	10
2.4	Chondrozyten in Kultur - Das 3-Phasen Modell der Arbeitsgruppe . .	11
2.4.1	Dedifferenzierung bei der Proliferation . . . . .	11
2.4.2	Zelltransplantation und <i>Tissue Engineering</i> . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Material . . . . .	19
3.1.1	Chemikalien . . . . .	19
3.1.2	Geräte und Software . . . . .	22
3.1.3	Verbrauchsmaterialien . . . . .	23
3.1.4	Ansätze . . . . .	23
3.2	Methoden . . . . .	25
3.2.1	Gewinnung und Kultivierung der isolierten Chondrozyten . .	25
3.2.2	Proliferation . . . . .	25
3.2.3	Kryokonservierung . . . . .	26
3.2.4	Humanserum . . . . .	26
3.2.5	Erzeugung der Alginat-Beads . . . . .	27
3.2.6	Elution aus den Alginat-Beads . . . . .	27
3.2.7	Chondrogenese nach der Alginatphase . . . . .	28
3.2.8	Pellets aus proliferierten Zellen (Direkte Chondrogenese) . . .	28
3.2.9	Zytokine . . . . .	29
3.2.10	Analytik . . . . .	29
3.2.11	Westernblotting . . . . .	30
3.2.12	Verarbeitung der Immunoblots . . . . .	31
3.2.13	Statistik . . . . .	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1	Zytokine in der Alginatkultur . . . . .	33

4.1.1	Einfluss von IGF-I und TGF- $\beta_1$ in der Alginatephase . . . . .	33
4.1.2	Einfluss von IGF-I . . . . .	36
4.1.3	Einfluss von TGF- $\beta_1$ . . . . .	39
4.1.4	Einfluss von PDGF . . . . .	41
4.2	Einfluss der kombinierten Zytokine . . . . .	43
4.2.1	PDGF-BB, TGF- $\beta_1$ und IGF-I (PIT) . . . . .	43
4.2.2	PIT Kombination – variierte TGF-Konzentrationen . . . . .	46
4.2.3	TGF zeitlich limitiert . . . . .	48
4.3	Erhöhte PDGF Konzentration in verschiedener Kombination . . . . .	50
4.4	Einfluss des reduzierten $O_2$ -Partialdrucks . . . . .	52
4.5	Zytokine in der Pelletkultur . . . . .	55
4.5.1	PIT in der Pelletkultur – direkte Chondrogenese . . . . .	55
4.5.2	Chondrogenese in der Pelletkultur nach Redifferenzierung in Alginate . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1	Zell- und gewebebasierte Therapieansätze . . . . .	62
5.2	Das 3-Phasen-Modell . . . . .	63
5.2.1	Die Randbedingungen für die Aufgabenstellung . . . . .	64
5.2.2	Die Alginatekultur als Basis für die Redifferenzierungsphase . .	65
5.2.3	Die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks während der Redif- ferenzierung . . . . .	66
5.3	PDGF-Effekte auf die Redifferenzierung in Alginate . . . . .	67
5.4	Messmethoden . . . . .	67
5.5	Hinweise aus der Analyse der Pseudochondrone . . . . .	68
5.6	Effekt von PIT in der Pelletkultur . . . . .	69
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>88</b>

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung der Arbeit

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden im Rahmen eines Forschungsprojektes durchgeführt, dessen Ziel die *in vitro* Herstellung von humanen Gelenkflächenimplantaten war. Am Modell des Minipigs war es gelungen, ein Verfahren zur extrakorporalen Züchtung von hyalinem Knorpel zu entwickeln, das von der Behandlung mit verschiedenen Zytokinen in drei zeitlich voneinander getrennten, mehrwöchigen Phasen profitierte. Die geringe Menge aus Knorpelbiopsien isolierbarer Chondrozyten macht zunächst eine signifikante Vermehrung der Zellen notwendig, was unter Zusatz eines mitogenen Wachstumsfaktors gelingt. In der folgenden zweiten Phase, der Redifferenzierung, muss der mit der Zellproliferierung einhergehende, unvermeidliche Verlust des differenzierten Phänotyps der Chondrozyten in Gegenwart differenzierend wirkender Zytokine wieder rückgängig gemacht werden. In der dritten und letzten Phase erfolgt die eigentliche Chondrogenese, die durch intensive Zell-Zell-Kontakte in sogenannten Pellet-Kulturen ausgelöst wird. Dieses erfolgreich am Tierversuch erprobte Protokoll ließ sich jedoch nicht ohne Veränderung auf das humane Modell übertragen, wobei vor allem die zur Redifferenzierung eingesetzten Bedingungen einer Anpassung zu bedürfen schienen.

Aus dieser Situation ergab sich die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung und Überprüfung, inwieweit der zusätzliche oder ersatzweise Einsatz von PDGF-BB, neben den bisher verwendeten Zytokinen IGF-I und TGF- $\beta_1$ , den Erfolg der Redifferenzierung wirkungsvoll unterstützen kann. Zusätzlich war zu klären, welcher Parameter sich für die Beurteilung der Ergebnisse als notwendig und ausreichend erweisen würde. Um weiterhin sicher zu sein, dass tatsächlich der Prozess der Redifferenzierung beurteilt würde und nicht etwa die mögliche Vermehrung eines Restes differenzierter Zellen, sollten alle experimentellen Untersuchungen mit Zellen durchgeführt werden, die wenigstens für acht Passagen *in vitro* proliferiert worden waren, da nur unter diesen Bedingungen Zellen mit differenziertem Phänotyp nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

## 2 Einleitung

### 2.1 Aufbau und Struktur des Gelenkknorpels

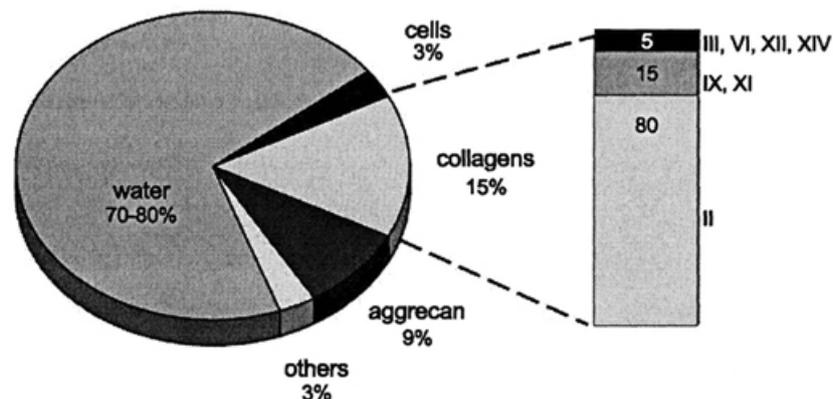
Der artikuläre Knorpel ist ein hochspezifisches Gewebe, das optimal an die Belastungen eines Gelenkes angepasst ist. Hyaliner Gelenkknorpel ist avaskulär, Blut- und Lymphgefäße fehlen ebenso wie eine Innervation. Unter physiologischen Bedingungen erfüllt er seine Hauptfunktionen, die Belastungsverteilung auf eine größtmögliche Oberfläche und die nahezu reibungsfreie Artikulation der beteiligten Gelenkflächen.

Die Versorgung des Knorpels erfolgt einzig über eine Kombination aus Diffusion der benötigten Nährstoffe aus der Synovialflüssigkeit, unterstützt durch die mechanische Kompression des Knorpels bei Belastung (mechanische Stoffkonvektion). Der ausbleibende Effekt der Mechanodiffusion bei fehlender Belastung trägt neben der Mechanotransduktion wesentlich zur Degeneration des Gelenkknorpels bei. Dabei müssen die Stoffe in zweifacher Hinsicht Barrieren überwinden, zum einen die Synovia, zum anderen die Knorpelmatrix, die durch Struktur und Ladung ihrer Bestandteile eine Diffusionsbarriere darstellt.

Der Aufbau des hyalinen Knorpelgewebes zeigt einige Besonderheiten. Zunächst gibt es mit den Chondrozyten nur einen einzigen Zelltyp, auch eine Stammzellpopulation wurde nicht nachgewiesen (Muir 1995). Bedingt durch die Avaskularität und die damit verbundene geringe Sauerstoffspannung spielt der anaerobe Stoffwechsel eine wesentliche Rolle bei der Energiegewinnung. Wenn der Knorpel als bradytrophes Gewebe sich dennoch als sehr stoffwechselaktiv zeigt (Buckwalter und Mankin 1997a), so lässt sich dies mit der äußerst niedrigen Zelldichte erklären. Direkte Zell-Zell-Kontakte kommen praktisch nicht vor. Allerdings gibt es eine intensive Kommunikation zwischen den Chondrozyten und der extrazellulären Matrix, deren Stoffwechsel durch die Chondrozyten vollständig kontrolliert wird.

Histologisch lässt sich im Gelenkknorpel eine Schichtung erkennen. Eine grobe Unterteilung orientiert sich an den wechselnden Strukturen des Kollagennetzwerkes. Danach unterscheidet man eine oberflächliche Zone mit parallel zur Oberfläche ausgerichteten Kollagenfibrillen von einer mittleren und einer tiefen, mit radiär angeordneten Kollagenbündeln. Im Übergang zum subchondralen Knochen sind die Kollagenfasern in der *Tide mark* verankert. Die Chondrozyten sind dabei säulenartig angeordnet und verlaufen senkrecht zur Gelenkoberfläche. Die Abgrenzung des Gelenkknorpels zum Gelenkraum bildet die Superficialzone. Sie stellt für den Knorpel auch immunologisch eine Diffusionsbarriere zum Gelenkinnenraum dar.

Die Knorpelsubstanz besteht nur zu einem geringen Anteil aus Chondrozyten. Den Hauptanteil bildet die extrazelluläre Matrix: Sie besteht im Wesentlichen aus Wasser, Kollagenen, Proteoglykanen, Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden (siehe Abb. 2.1). In der Trockenmasse stellen die Kollagene den Hauptbestandteil dar, sie geben dem Knorpel die Struktur.



**Abbildung 2.1:** Fraktionen des Gelenkknorpels (nach Aigner und Stöve 2003).

### 2.1.1 Kollagen

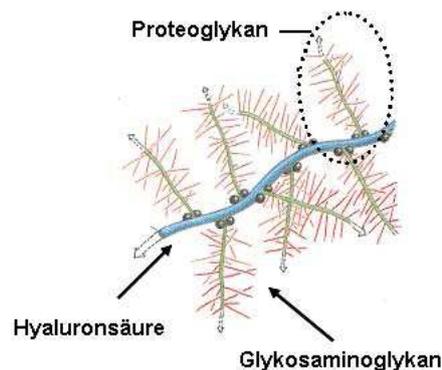
Der Anteil der verschiedenen Kollagene im Gelenkknorpel an der Trockenmasse liegt zwischen 50-90% (Muir 1995). Den größten Teil des Kollagens stellt dabei der Typ II. Die Typen VI, IX, X und XI spielen zwar quantitativ eine untergeordnete Rolle, qualitativ ermöglichen sie jedoch die Quervernetzung zwischen den Kollagenfasern und vermitteln zudem den Kontakt der Chondrozyten zur extrazellulären Matrix. Diese mechanische Verknüpfung mit seiner Umgebung erlaubt dem Chondrozyten, auf veränderte Druck- und Umgebungsbedingungen zu reagieren, zum Beispiel durch Synthese neuer Kollagen- und Proteoglykanmoleküle. Diese beiden Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels bilden als faserverstärkter Werkstoff die Grundlage für die Elastizität und die beachtlichen mechanischen Eigenschaften des Knorpels (Junqueira und Caneiro 1996). Während die eingelagerten Proteoglykane als Folge ihrer hohen Affinität zu Wasser einen starken osmotischen Druck erzeugen, wird die Wasseraufnahme durch das enorm zugfeste dreidimensionale Gerüst aus Kollagenfasern begrenzt. Dementsprechend ist der Faserverlauf dabei in der unteren und mittleren Zone auch nahezu vertikal, um erst bei Annäherung an die obere Begrenzung bogenförmig in einen parallelen Verlauf überzugehen. Diese Konstruktion erlaubt es damit optimal, gleichzeitig hohe vertikale und tangential wirkende Kräfte aufzufangen.

Die für die fibrillären Kollagene charakteristische molekulare Grundstruktur bilden jeweils drei  $\alpha$ -Helices mit der repetitiven Tripeptid-Sequenz Gly-X-Y, die sich zu einer Tripelhelix verdrillen. Die mit X und Y bezeichneten Platzhalter stehen im wesentlichen für die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin (Löffler und Petrides 1998). Der Glycinrest an jeder dritten Position ist eine strukturelle Voraussetzung für die Existenz der Tripelhelix. Denn die kleinen Glycinreste befinden sich im gedrängten Zentrum der Tripelhelix, wo keine andere Aminosäure mehr Platz findet. Bei der Bildung der Tripelhelices sind Amino- und Carboxyl-Telopeptide behilflich, die nach der Sezernierung extrazellulär mit Hilfe spezifischer Proteasen abgespalten werden. Erst anschließend aggregieren die tripelhelikalen Moleküle zu Kollagenfibrillen, bis sie einen Durchmesser von 10-100 nm erreichen (Löffler und Petrides 1998). Die Tripelhelix kann wie bei Kollagen II und X jeweils aus drei identischen Polypeptidketten entstehen (Homotrimere), oder wie bei Kollagen VI, IX und XI aus zwei oder mehr verschiedenen Ketten (Heterotrimere) (Gelse et al. 2003). Kollagen Typ II ist charakteristisch für den hyalinen Gelenkknorpel, kommt aber z.B. auch im Glaskörper des Auges vor.

### 2.1.2 Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Die zweite große Stoffgruppe in der Grundsubstanz des hyalinen Knorpels bilden die Glykosaminoglykane (GAG). Diese bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die lange, unverzweigte Polysaccharide bilden. Die Disaccharide setzen sich zumeist aus Glukuronsäure und einem Hexosamin, wie Glukosamin oder Galaktosamin, oder deren Derivaten zusammen (Löffler und Petrides 1998). Als Folge der negativ geladenen Carboxylgruppen und Sulfatreste der Disaccharide entstehen mit den Glykosaminoglykanen (GAG) im Knorpel Makromoleküle mit hoher negativer Nettoladung (Buckwalter und Mankin 1997a). Unter den im Knorpel vorkommenden GAG stellen Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat die Hauptgruppe (Dijkgraaf et al. 1995). Andere GAG sind Dermatan- und Heparansulfate. Proteoglykane entstehen, wenn sich GAG unterschiedlicher Länge glykosidisch an ein zentrales Protein binden. Unter den Proteoglykanen nimmt Aggrecan den größten und osmotisch wirksamsten Anteil ein. Wichtige andere Vertreter sind Versikan, Decorin, Biglykan und Fibromodulin. Die Unterschiede bestehen im Wesentlichen in der Länge des Kernproteins, der Anzahl und Art der gebundenen GAG und somit auch in ihrer Größe. Bei dem im hyalinen Gelenkknorpel vorkommenden Aggrecan hat das Kernprotein ein Molekulargewicht von ca. 250,000 Dalton (Hardingham und Fosang 1992), an welches hauptsächlich Keratansulfate und Chondroitinsulfate gebunden sind. Die Bindung großer Mengen dieser GAG führt zu einer makromolekularen Struktur, welche oft als „Flaschenbürste“ (Muir 1995, Dudhia 2005) umschrieben wird (siehe Abb. 2.2). Die Aggrecane verbinden sich über eine entsprechende Bindungsregion mit Hyaluronsäure, einem Polysaccharid aus sich wiederholenden Glukuronsäure-

und N-Acetyl-Glukosaminresten von teilweise bis über 10.000 nm Länge (Buckwalter und Rosenberg 1988). Hierdurch entstehen hochkomplexe polyanionische Proteoglykanaggregate, welche im Kollagenetzwerk des Knorpels eingeschlossen sind. Aufgrund ihrer hohen negativen Ladung binden sie große Mengen Wasser und Natrium-Ionen. Der entstehende hohe osmotische Quellsdruck ist die Grundlage für die besondere Eigenschaft des Knorpels, hohen Druckspitzen widerstehen zu können. Eingeschlossen im Kollagenetzwerk sorgt die hohe Zugfestigkeit der Kollagenfasern für eine begrenzte Ausdehnung des Proteoglykan-Gels.



**Abbildung 2.2:** Hyaluronsäure und Proteoglykane als Aggregat (aus Seifner 2006).

## 2.2 Reparaturmechanismen

Bei Verletzung der Knorpeloberfläche wird die harmonische Partnerschaft zwischen Kollagenfasern und Proteoglykanen aufgehoben. Oxidativer Stress zerstört Hyaluronsäure, so dass hierdurch die Bildung von Proteoglykankomplexen und damit die Aggregation abnimmt (Muir 1995). Eine Desaggregation erhöht die Anzahl der gelösten Proteoglykan-Moleküle und damit den osmotisch bedingten Wassereinstrom. Gleichzeitig beginnt sich das zunächst noch unbeeinträchtigte dreidimensionale Kollagenetzwerk aufzulösen, mit der Folge einer erhöhten Permeabilität und eines weiter zunehmenden Wassergehalts. Mit der Abnahme der Steifigkeit des makromolekularen Netzwerkes verliert der Knorpel sukzessive seine besonderen biomechanischen Eigenschaften (Buckwalter und Mankin 1997b). Steht der Stoffwechsel im gesunden Knorpel unter der Kontrolle anabol wirkender Zytokine wie IGF-I und TGF- $\beta_1$ , die die *de novo* Synthese von Matrixbestandteilen fördern (Davies et al. 2008), reagieren die Chondrozyten ab einem bestimmten Verletzungsausmaß mit Proliferation und gesteigerter metabolischer Aktivität. Als Stressantwort sezernieren die Chondrozyten jetzt unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), welches rasch durch den Knorpel

diffundiert und die Expression von Metalloproteinasen (MMP) stimuliert. Vermittelt durch Zytokine wie Interleukin-I wird so der enzymatische Abbau weiterer Matrixbestandteile vorangetrieben.

Erreicht der Defekt schließlich den subchondralen Knochen, kommt es zur Verletzung von subchondralen Blutgefäßen und zur Einblutung in den Defekt. Nach Organisation dieser Einblutung als Fibringerinnsel (*Fibrin clot*) differenzieren sich die im Blut vorhandenen mesenchymalen Stammzellen zu morphologisch den Chondrozyten ähnlichen Zellen. Die von ihnen gebildete Knorpelmatrix gleicht dabei eher dem biomechanisch minderwertigen Faserknorpel mit den charakteristisch hohen Anteilen von Kollagen des Typs I. Es handelt sich dabei also um Narbenbildung und keine *restitutio ad integrum* im eigentlichen Sinne. Die Reaktion mit Bildung von mechanisch minderwertigem Kollagen-I haltigen Gewebe wird in der englischen Literatur als *Scarring* Reaktion bezeichnet.

## 2.3 Therapiekonzepte

Bei ausgeprägten Arthrosen und entsprechendem Alter des Patienten steht vor allem bei Knie- und Hüftgelenken der alloarthroplastische Gelenkersatz im Vordergrund. Bei jüngeren Patienten mit durch Fehlstellung bedingter lokalisierte Arthrose kann eine Umstellungsosteotomie den Prozess des arthrotischen Gelenkverschleißes verlangsamen. Vor allem bei umschriebenen, traumatisch bedingten Knorpeldefekten des jüngeren Patienten kommen operative Therapien zum Einsatz, hierbei wird zwischen Reparatur und Regeneration unterschieden (Resinger et al. 2004). Die operative Therapie von lokalisierten Defekten besteht zumeist in einer Eröffnung des subchondralen Knochens, um den oben beschriebenen Effekt der Defektfüllung durch von mesenchymalen Stammzellen gebildeter Knorpelmatrix zu erreichen.

Erstmalig beschrieben wurde ein Anbohrung des subchondralen Knochens von Pridie (Pridie 1959). Variationen der Pridie-Bohrung sind die Mikrofrakturierung und die Abrasionsarthroplastik. Die Therapie zielt also auf Stimulation der körpereigenen Reparaturmechanismen ab, wobei es zu dem o.g. Problem einer Defektreparatur mit langfristig biomechanisch minderwertigem Ersatzgewebe kommt, eine *restitutio ad integrum* kann nicht erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Entnahme osteochondraler Zylinder aus wenig belasteten Gelenksarealen und deren Reimplantation in den Defekt. Das Verfahren wird als *Osteochondral Autologous Transplantation System* (OATS) bezeichnet. Ein Nachteil besteht in der Defektsetzung an der Entnahmestelle, einer bis dahin gesunden Gelenkfläche. Um die Ausbildung von biomechanisch minderwertigem Knorpelersatzgewebe zu vermeiden, kommen Techniken zur Knorpelregeneration zum Einsatz. Hierbei sind in der klinischen Anwendung vor allem Variationen der zuerst von Brittberg et al. 1994 beschriebenen Methode der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) zu nennen, siehe Abschnitt 2.4.2 (Brittberg et al. 1994).

## 2.4 Chondrozyten in Kultur - Das 3-Phasen Modell der Arbeitsgruppe

Nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Modell werden aus einer geringen Menge – wie sie etwa durch eine Biopsie gewonnen werden kann – aus Gelenkknorpel isolierter Chondrozyten *ex vivo* Knorpelpellets generiert. Dies gelingt, indem den Zellen in drei aufeinander folgenden, zeitlich getrennten Phasen durch Applikation geeigneter Kulturbedingungen Gelegenheit gegeben wird, das jeweilige Etappenziel zu erreichen. Die erste Phase ist der Vermehrung gewidmet, um eine für die Erzeugung von Knorpelpellets ausreichende Zellzahl zu generieren. So induzieren im Rahmen der sehr effektiven konventionellen Monolayertechnik äußere Stimuli, wie der Kontakt zum Boden der Kulturflasche und der Einsatz von mitogenen Zytokinen, die Chondrozyten zur Mitose. Als Folge davon wird ein Verlust des differenzierten Phänotyps in Kauf genommen, erkennbar daran, dass die Synthese knorpelspezifischer extrazellulärer Produkte sistiert (siehe 2.4.1).

In einer anschließenden zweiten Phase erfolgt die Redifferenzierung. Dazu werden die Zellen reversibel in Alginate eingeschlossen. Diese Alginatephase dient dem Ziel, den Zellen unter Mithilfe anaboler Zytokine und vor allem durch Vermeidung mitogener Reize wieder ihre Fähigkeit zur Bildung von Knorpelgewebe zurückzugeben. Der Einschluß in Alginate wird in diesem Modell deshalb als Redifferenzierungsphase bezeichnet. In der dritten und letzten Phase werden jeweils etwa  $10^6$  Chondrozyten nach der Elution aus dem Alginate-Gel zu Aggregaten zentrifugiert. Am Beispiel der Schweinechondrozyten gelang es, in solchen *High-Density*-Kulturen in zwei bis drei Wochen unter geeigneten Bedingungen implantationsfähige Knorpelpellets herzustellen.

Jede der drei Phasen zeichnet sich durch spezifische Kulturbedingungen aus. Dabei unterscheiden sich sowohl die verwendeten Medien und Mediumzusätze wie Zytokine, als auch Umgebungsparameter wie der Sauerstoffpartialdruck. Unter Verwendung von Gelenkchondrozyten vom Schwein (Göttinger Mini-Pig) sind die Protokolle der einzelnen Phasen soweit etabliert, dass der Einsatz im praktischen Tierversuch mit Implantation von *ex vivo* erzeugten Knorpel-Knochenzylindern (Knorpelpellets auf Hydroxylapatitkeramikzylindern) erfolgreich erprobt werden konnte (Petersen 2008). Nicht gelungen ist bisher allerdings die direkte Übertragung dieses Modells auf menschliche Chondrozyten.

### 2.4.1 Dedifferenzierung bei der Proliferation

#### Was ist Dedifferenzierung?

Ein mehrzelliger Organismus enthält eine große Zahl verschiedener Zelltypen mit spezialisierten Funktionen. Den Prozess ihrer Entstehung aus pluripotenten Stammzellen bezeichnet man als Differenzierung. Unterschiedlich differenzierte Zellen exprimie-

ren spezifische Genmuster und unterscheiden sich oft auch in ihrer Morphologie. Die Differenzierungsrichtung von Zellen ist dabei einige Zeit vor der Ausprägung ihrer Differenzierungscharakteristika festgelegt, ein Umstand, der als Determination bezeichnet wird (Böcker et al. 1997). Entsteht neues Gewebe durch Vermehrung ausdifferenzierter Zellen, bleibt die Determination bei den Tochterzellen erhalten. Andererseits kann der Bedarf einer großen Zahl differenzierter Zellen auch durch Differenzierung von Stammzellen gedeckt werden, nachdem diese vermehrt wurden. Sowohl der Differenzierungsprozess als auch die Stimulation der Zellteilung sind abhängig von verschiedenen endokrinen Faktoren, von Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakten und anderen physiologischen Umgebungsparametern.

Im adulten, hyalinen Gelenkknorpel fehlt eine Stammzellpopulation, der Chondrozyt ist Empfänger und Sender von Signalen zur Differenzierung und zur Steuerung des Zellzyklus (Muir 1995). Diese Eigenschaften von Chondrozyten können damit prinzipiell auch genutzt werden, das Verhalten der Zellen durch gezielte Veränderung der Kulturbedingungen zu steuern. Außer in Monolayer-Kulturen sind die mitogen wirkenden Kontakte der Chondrozyten mit den Wänden von Plastikkulturgefäßen unerwünscht, weil sie den Eintritt der Zellen in die  $G_0$ -Phase verhindern. Ein experimenteller Ausweg aus dieser Falle ist der Einschluss von Chondrozyten in dreidimensionale Trägersysteme wie Alginat-, Agarose-Gel und andere Polymere (Häuselmann et al. 1994, Sittinger et al. 1994). In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen kann hier sogar eine gewisse phänotypische Varianz erreicht werden. So gelangen Tallheden et al. die Bildung von Adipozyten aus Chondrozyten durch eine Behandlung, wie sie für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen bekannt ist (Tallheden et al. 2003). Dieses als Plastizität bekannte Phänomen ließ sich auch mit dedifferenzierten Chondrozyten verifizieren, wie sie aus Monolayerkulturen unter Einfluss von Zytokinen entstehen (Barbero et al. 2003). Chondrozyten sind also unter Umständen weniger determiniert, als bisher angenommen.

### **Dedifferenzierung bei der Proliferation – Redifferenzierung in Alginat**

Werden Chondrozyten nach der Isolierung in Monolayerkulturen kultiviert, so tritt ein progressiver Verlust an knorpelspezifischen Eigenschaften ein, der begleitet wird von einer Veränderung der Morphologie hin zu einer spindelförmigen, fibroblastoiden Form der Zellen (Benya und Shaffer 1982, Bonaventure et al. 1994). Entscheidend ist eine Reduktion der Fähigkeit zur Synthese der für Chondrozyten charakteristischen Produkte Proteoglykane und Kollagen Typ II (Stokes et al. 2001). Stattdessen findet sich eine vermehrte Expression des für die Narbenbildung typischen Kollagens Typ I, welche mit Anzahl der Passagierungen zunimmt (Schnabel et al. 2002). Im Rahmen von Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich in humanen Gelenkchondrocyten nach Vermehrung in vier und mehr Passagen nur noch sehr geringe Mengen an Glykosaminoglykanen und kein Kollagen Typ II nachweisen ließ.

Um einerseits eine ausreichende Zellzahl für die experimentellen Untersuchungen

bereitstellen zu können, andererseits den Anteil einer Restpopulation mit differenziertem Phänotyp auf ein Minimum zu reduzieren, wurden alle Messungen grundsätzlich mit Zellen nach der achten Passage durchgeführt. Für humane artikuläre Chondrozyten musste hierfür das Proliferationsprotokoll angepasst werden. In aufwendigen Vorversuchen von Frau Goepfert (in der Arbeitsgruppe) wurde das Medium für die Proliferationsphase unter Verwendung von bFGF und EGF als zugesetzte Zytokine optimiert, hier zeigte sich zum Beispiel auch eine Abhängigkeit von bestimmten Chargen fötalen Kälberserums zum Erreichen einer hohen Proliferations- und Überlebensrate über höhere Passagen.

In dem Modell der Arbeitsgruppe werden die Chondrozyten zum Zwecke der Redifferenzierung reversibel in Alginat-Beads eingeschlossen. Alginat, ein lineares Polysaccharid isoliert aus braunen Meeralgen, ist ein Copolymer aus L-Guluronsäure und D-Mannuronsäure über  $\beta$ -1,4 und  $\alpha$ -1,4 glykosidisch verknüpft, das in Gegenwart von Calcium-Ionen geliert. Chondrozyten lassen sich so reversibel in eine Matrix einschließen. Die Elution gelingt relativ einfach und vor allem zellschonend durch Zugabe eines Chelat-Bildners, welcher die Calcium-Ionen bindet und so zur Depolymerisation des Gels führt. So eluierte Zellen lassen sich dann zum Beispiel für das *Tissue Engineering* und eine Chondrogenese verwenden oder aber für einen längeren Zeitraum unter Vermeidung einer Dedifferenzierung kultivieren. Unter Einschluss in Alginat konnten Häuselmann et al. noch nach acht Monaten die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen beobachten (Häuselmann et al. 1994). Chubinskaya et al. zeigten den Erhalt der Synthese von mRNA für Prokollagen II über zwei Monate, von Aggrecan und MMPs über acht Monate der Kultivierung in Alginat (Chubinskaya et al. 2001). Die in Alginat eingeschlossenen Chondrozyten bilden mit der synthetisierten extrazellulären Matrix mikroskopisch den Chondronen ähnelnde Strukturen, allerdings wird hier von Pseudochondronen gesprochen. Die perizelluläre Matrix (PZM) unterscheidet sich von der originären z.B. in der Ausrichtung der Kollagenfibrillen (Dimicco et al. 2007), gleicht aber in der Zusammensetzung der originären Knorpelmatrix (Schulze et al. 2000). In der synthetisierten PZM lassen sich dabei die Zellprodukte differenzierter Chondrozyten wie Kollagen Typ II und Aggrecane nachweisen (Häuselmann et al. 1996, Mok et al. 1994, Petit et al. 1996).

Ein Transfer von dedifferenzierten Chondrozyten in „dreidimensional“ angelegte Kulturen, etwa Alginat-Beads oder Agarosegele, kann zu einer Redifferenzierung im Sinne einer Änderung des Phänotyps mit neuem Nachweis der Synthese der für differenzierte Chondrozyten typischen Kollagene und Proteoglykanen führen (Stokes et al. 2001). Der Einschluss in Alginat wirkt dabei als Redifferenzierungsfaktor. Barlic et al. zeigten 2008 die Wiederzunahme der Synthese von Kollagen und Aggrecan nach Einschluss von vorher in Monolayer-Kulturen expandierten Chondrozyten (Barlic et al. 2008). Eine deutliche Zunahme des für die Regulation der Expression des Gens für Kollagen II (COL2A1) wichtigen Transkriptionsfaktors SOX9 (*Sry-related high-mobility-group box*) durch den Einschluss in Alginat zeigten u.a. Tew und Hardingham (Tew und Hardingham 2006). Der Einschluss in Alginat hindert

die Bestandteile der synthetisierten extrazellulären Matrix (größenabhängig) an der Diffusion in das Kulturmedium, so dass ein Raum und damit eine Voraussetzung für die komplexe Interaktion von löslichen Wachstumsfaktoren, der perizellulären Matrix und dem Chondrozyten geschaffen ist. Diese Interaktionen – *in vivo* Teil der Kommunikation zwischen Zelle und Umgebung – sind Stimuli im Redifferenzierungsprozess. Beispielsweise induziert hinzugesetztes Kollagen Typ II in der perizellulären Matrix unter Einfluss von TGF- $\beta_1$  die Synthese von Prokollagen und Proteoglykanen (Aggrecan) (Qi und Scully 1998). Über  $\beta_1$ -Integrine beeinflusst die Umgebung des Chondrozyten die Transkription von TGF- $\beta_1$  (Scully et al. 2001).

### Rekombinante Zytokine in der Alginatphase

Die in der Alginatphase eingesetzten rekombinant hergestellten polypeptidischen Zytokine IGF-I, TGF- $\beta_1$  und PDGF-BB sind autokrine und parakrine Regulatoren des Chondrozytenstoffwechsels (Olney et al. 2004). Wie auch das in der Proliferationsphase eingesetzte bFGF sind sie Bestandteil der komplexen Differenzierungsvorgänge im Wachstum. In der physiologischen Umgebung des reifen Chondrozyten tragen sie zur Homöostase zwischen Matrixauf- und abbau bei. Die Untersuchung des Einflusses dieser Zytokine bei der Degeneration von Knorpel im Rahmen von Verletzungen oder des chronischen Substanzverlustes im Rahmen einer Arthrose stellt dabei einen eigenen Forschungsbereich dar. Die Reaktion von kultivierten Chondrozyten auf diese Zytokine ist mitunter abhängig von den Kulturbedingungen und dem vorliegenden Differenzierungsgrad. Weiterhin lassen sich die Wirkweisen der Zytokine kaum isoliert betrachten, da sie sich gegenseitig in ihrer molekularbiologischen Wirkung modulieren können.

Der auch in dieser Arbeit verwendete *Transforming growth factor* (TGF) gehört zu der TGF-Superfamilie, die außer den TGFs selbst noch die Gruppe der BMPs (*Bone-morphogenetic proteins*) umfasst. Das Homodimer TGF- $\beta$  liegt in drei Isoformen vor ( $\beta_{1-3}$ ), es erreicht hohe Konzentrationen in Knochen und Knorpelzellen. Isoformen werden von den Chondrozyten exprimiert und sezerniert (Villiger und Lotz 1992), im adulten Knorpel liegt es zumeist latent, d.h. in inaktiver, an Bindungsproteine gebundener Form vor (D'Angelo und Pacifici 1997). Die Bindung der Faktoren der TGF-Superfamilie, namentlich TGF und BMP, an zelloberflächliche Rezeptoren löst eine komplexe Kaskade aus, die in der Aktivierung intrazellulär gelegener SMAD-Proteine (siehe Abkürzungsverzeichnis) mündet. Diese können nach Translokation in den Zellkern komplexe Zellprozesse steuernde Transkriptionsfaktoren wie SOX9 aktivieren. Die Wirkung von TGF wird u.a. durch inflammatorische Faktoren, etwa Interleukin- $\beta_1$  -mit welchem es auch bei der Glucoseaufnahme interferiert (Shikhan et al. 2004)- oder TNF (*Tumornekrosefaktor*) beeinflusst. Letztere erfolgt über die Modulation der Bindungsaffinität dieser SMAD-Proteine im Zellkern (Roman-Blas et al. 2007, Li et al. 2005). Die Vielzahl der von den TGFs ausgelösten Signalkaska-

den, ebenso wie die der möglichen Ziele, ergibt eine hohe Anzahl von möglichen Interferenzen mit anderen Faktoren.

Der Effekt der Gabe von TGF- $\beta_1$  auf humane Chondrozyten fällt je nach Kulturbedingung und Differenzierungsgrad der Chondrozyten unterschiedlich aus. Auf frisch isolierte primäre Chondrozyten übt TGF- $\beta_1$  zunächst einen starken mitogenen Effekt aus, der jedoch mit fortschreitender Passagierung und Dedifferenzierung abnimmt (Guerne et al. 1994). Der mitogene Effekt von TGF- $\beta_1$  auf differenzierte Zellen wird in Anwesenheit von Serum verstärkt, was auch für eine Interaktion von TGF- $\beta_1$  mit anderen Wachstumsfaktoren spricht (Frazer et al. 1994). Ein Beispiel ist der Synergieeffekt von TGF- $\beta_1$  und IGF-I. Er beruht auf der Beeinflussung der Expression des IGF bindenden Proteins nach TGF-Gabe (Morales 1997). Einen starken Einfluss auf den TGF- $\beta_1$ -Effekt hat auch die Natur des Trägers, auf dem die Zellen *in vitro* kultiviert werden. Während TGF- $\beta_1$  die Kollagen II-Synthese bei frisch isolierten Kaninchenchondrozyten hemmt, wenn sie mit Hilfe der Monolayertechnik vermehrt werden (Chadjichristos et al. 2002), konnten Domm et al. bei frisch isolierten, auf PGA Trägern aufgebrachtten bovinen, artikulären Chondrozyten eine Zunahme der Proteoglykan- und Kollagensynthese nachweisen (Domm et al. 2002). Werden mitogene Effekte, induziert etwa durch Kontakte mit der Plastikoberfläche üblicher Zellkulturflaschen, vermieden, wie dies durch Kultivierung in Alginat geschieht, kann TGF- $\beta_1$  bei dedifferenzierten Chondrozyten die Syntheseraten von Proteoglykanen stimulieren (Jenniskens et al. 2006). In solchen und ähnlichen 3D-Kulturen führt TGF- $\beta_1$  auch zur Reexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II, ein Effekt, der insbesondere auch in Wechselwirkung mit anderen Zytokinen oder Matrixbestandteilen verstärkt wird (Jakob et al. 2001, Yaeger et al. 1997, Chopra und Anastassiades 1998, Qi und Scully 1998). Abhängig von den Umgebungsparametern und dem Differenzierungsgrad der Zielzelle unterliegt dabei auch die Kollagenvernetzung dem Einfluss von TGF- $\beta_1$  (Bastiaansen-Jenniskens et al. 2008).

**Insulin-like growth factor** (IGF) ist ein Homolog des Proinsulins. Es werden die beiden Isoformen I und II unterschieden. Im adulten Organismus wird IGF-I einerseits zentral in der Leber gebildet, wo es unter dem regulierenden Einfluss von Wachstumshormon (*growth hormone*, GH) steht. Andererseits wird es in verschiedenen Fällen auch lokal synthetisiert und spielt als anaboler Faktor eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase. Die anabole Wirkung von IGF auf Chondrozyten in Kultur ist lange bekannt und gut untersucht: IGF-I ist in der Synovialflüssigkeit nachweisbar (Schalkwijk et al. 1989), auf den Knorpel hat es sowohl mitogene (Trippel 1995, Blunk et al. 2002) wie auch matrixfördernde Wirkungen (McQuillan et al. 1986). Im Serum und im Gewebe wird IGF dabei an IGF-bindende Proteine gekoppelt (IGFBP), es werden sechs verschiedene Homologe unterschieden. Diese Bindungsproteine modulieren die Wirkung von IGF an der Zielzelle. Sie können eine Stimulation oder Inhibition des IGF-Effektes auf die Zelle haben. Die Expression der Bindungsproteine von den Chondrozyten unterliegt dabei außer dem Einfluss von IGF selbst auch

anderen Faktoren (Olney et al. 1993). So wird sie, wie bereits erwähnt, von TGF- $\beta_1$  stimuliert (Morales 1997). Die stimulierende Wirkung von IGF auf die Proliferation (gemessen an der DNA Syntheserate) und Proteoglykan-Synthese (gemessen als Zunahme der Aggrecan-mRNA Expression) wird zusätzlich in Gegenwart von Kollagen Typ II in der perizellulären Matrix gesteigert. Grundlage für diesen additiven Effekt ist möglicherweise die Tatsache, dass beide Signale, der über  $\beta_1$ -Integrine vermittelte Kontakt mit Kollagen Typ II wie auch die Aktivierung des IGF-I-Rezeptors, in den MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Weg münden (Shakibi et al. 1999, Scully et al. 2001). Die Beteiligung von IGF-I und TGF- $\beta_1$  an der chondrogenen Differenzierung der Vorläuferzellen der Chondroblasten hat sie zu bevorzugten Kandidaten zur Unterstützung der Knorpelbildung *in vitro* gemacht. Im Tiermodell war dieser Ansatz häufig erfolgreich (Petersen et al. 2008), im humanen System weniger. Diese Erfahrung führte zu der Idee, die Wirkung eines weiteren Zytokins hinsichtlich der Unterstützung der Redifferenzierung dedifferenzierter humaner Chondrozyten zu überprüfen. Hier bot sich ersatzweise oder auch ergänzend der Einsatz von PDGF an.

*Platelet-derived growth factor* ist ein Polypeptiddimer, welches ursprünglich in Thrombozyten nachgewiesen wurde. Aus den zwei Polypeptiden A und B setzen sich die PDGF-Isoformen AA, AB und BB zusammen. Inzwischen konnte jedoch eine Beteiligung an Wachstum und Regeneration verschiedener Gewebe mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden. Dabei vermitteln PDGF-Rezeptoren bei Osteoblasten und Osteoklasten (z.B. Hock und Canalis 1994) sowie Fibroblasten bzw. Tendozyten (Thomopoulos et al. 2007, Haupt et al. 2006) neben mitogenen vor allem auch chemotaktische Signale.

In klinischen Pilot-Projekten wird z.B. die Behandlung periodontaler Defekte mit PDGF untersucht (Hollinger et al. 2008). Auf epiphysäre Chondrozyten in Kultur wirkt PDGF proliferierend (Olney et al. 2004). Für eine mögliche Anwendung in der Defektheilung von Knorpel bzw. das *Tissue Engineering* sprechen neuere Befunde von Mishima und Lotz, die über das chemotaktische, die Migration von Chondrozyten fördernde Potential von PDGF berichten (Mishima und Lotz 2008). In einer Studie an bovinen artikulären Chondrozyten konnte Chopra, neben einer direkten Stimulation der Synthese von Proteoglykanen durch PDGF, auch eine synergistische Wirkung von TGF- $\beta_1$  und PDGF demonstrieren (Chopra und Anastassiades 1998). Andere Autoren beschreiben positive Effekte von PDGF sowohl auf die Proliferation, als auch auf die Proteoglykansynthese in Chondrozyten-Kulturen (Kieswetter et al. 1997). Dabei fällt als Besonderheit auf, dass PDGF gleichzeitig die Entwicklung bzw. Reifung von Chondrozyten der Wachstumsfuge im Rahmen der enchondralen Ossifikation behindert (Kieswetter et al. 1997). Darüberhinaus sind auch permissive Effekte von PDGF bekannt geworden. So berichten Lohmann et al. über eine erhöhte Knorpelneubildung im Muskelpouch von Mäusen, nachdem die Chondrozyten mit PDGF-BB vorbehandelt wurden (Lohmann et al. 2000). Auch eine Vorbehandlung mit PDGF-BB in der Expansionsphase kann die Fähigkeit kultivierter Chondrozyten

zur Redifferenzierung (Jakob et al. 2001) oder Chondrogenese (Francioli et al. 2007) erhöhen.

## 2.4.2 Zelltransplantation und *Tissue Engineering*

Die Therapie umschriebener Gelenkknorpeldefekte mit Chondrozyten wurde erstmals von Brittberg et al. beschrieben (Brittberg et al. 1994). Die unter der Bezeichnung „Autologe Chondrozytentransplantation“ (ACT) bekannt gewordene Methode umfasst die Isolierung von autologen Chondrozyten aus einer Knorpelbiopsie, die dann extrakorporal vermehrt werden, um sie anschließend in den Defekt zu transplantieren. Die proliferierten Chondrozyten wurden ursprünglich als Suspension unter einen Periostlappen injiziert, um sie über dem Defekt zu lokalisieren. Eine modifizierende Weiterentwicklung stellt die matrixassoziierte ACT dar (MACT), in der die Chondrozyten nicht direkt in den Defekt injiziert, sondern vor der Implantation an ein biodegradierbares Trägermaterial gekoppelt werden. Hierbei sind verschiedene Materialien im Tierexperiment, aber auch in der klinischen Anwendung im Einsatz, etwa Kollagen-Gele und Polymere. Vliese aus Hyaluronsäure oder Kollagen finden sich in Erprobung durch verschiedene Arbeitsgruppen (Marlovits et al. 2004). ACT und MACT befinden sich bereits in der klinischen Anwendung, in einer Studie von Bartlett et al. zeigen sich hierbei allerdings auch bioptisch hohe Raten Faserknorpels oder faserknorpeliger Anteile (Bartlett et al. 2005). Henderson et al. veröffentlichten 2005 gute subjektive, radiologische und arthroskopische Ergebnisse nach ACT (Henderson et al. 2005). Gobbi et al. als Vertreter eines MACT-Systems behandelten und untersuchten mit guten klinischen Ergebnisse ein Patientenkollektiv (mit n=32) mit Hyalograft-C, einem mit autologen Chondrozyten besiedeltem auf Hyaluronsäure basierendem Trägersystem. Die Anzahl der histologisch untersuchten Biopsien ist mit 6 dabei sehr gering, der Beobachtungszeitraum von 24 Monaten als kurz einzuschätzen (Gobbi et al. 2006). Marcacci et al. wiesen bei einer Multizenterstudie mit höheren Patientenzahlen und im Schnitt längeren Beobachtungszeiträumen ähnlich gute Ergebnisse mit dieser Methode der MACT nach (Marcacci et al. 2005).

Die Evaluationen subjektiver klinischer Parameter durch Scores, etwa nach der *International Knee Documentation Committee Subjective Evaluation Form*, oder die Auswertung nach den makroskopischen Ergebnissen durch Arthroskopien und bildgebender Verfahren, wie dem *Cartilage Repair Assessment Score* der ICRS (*International Society for Cartilage Repair*), zeigen während der Beobachtungszeitäume meist gute Ergebnisse. Die Möglichkeit zur qualitativen histologischen Untersuchung sind dabei eingeschränkt: Zum einen lassen sich aus ethischen Gründen die transplantierten, eingehheilten Knorpelareale nicht wieder entfernen, zum anderen sind die Beobachtungszeiträume kurz. Was nach zehn Jahren oder mehr aus den reimplantierten Chondrozyten wird, ist daher fraglich.

Aussagekräftige, invasive Untersuchungsmöglichkeiten bietet nur das Tiermodell.

In Untersuchungen an Schweinen, bei denen cartilaginäre Defekte durch Implantation von trägergekoppelten Chondrozyten therapiert wurden, zeigten Filova und Mitarbeiter zwar die Bildung von Kollagen II und Proteoglykanen, sowie von Gewebe mit ähnlicher Morphologie wie beim hyalinen Knorpel (Filova et al. 2007), doch ohne Zweifel an der Qualität und Nachhaltigkeit am Konzept der Zelltransplantation wirklich ausräumen zu können. Der Ersatz geschädigten Knorpels durch minderwertigen, Kollagen Typ I enthaltenden Knorpel trägt bereits den Keim der Arthrose in sich. Eine Alternative zur Zelltransplantation ist die Gewebeerzeugung *in vitro*, also das *Tissue Engineering* von hyalinem Knorpel. Dieses Konzept liegt den etablierten Modellen verschiedener Arbeitsgruppen zugrunde, das zumindest den wichtigen Vorteil einer Qualitätskontrolle vor der Implantation bietet. Die Realisierbarkeit des Konzepts der *in vitro* Herstellung osteochondraler Implantate für die Behandlung von Gelenkflächenschäden konnte durch die Ergebnisse im Tierversuch eindrucksvoll bestätigt werden (Petersen et al. 2008). Allerdings müssen vor Beginn einer klinischen Anwendung noch wenigstens zwei wichtige Probleme gelöst werden. Das eine betrifft die Wahl eines geeigneten biodegradierbaren Trägermaterials, das andere ein Verfahren zur effektiven Redifferenzierung humaner, *in vitro* expandierter Chondrozyten. Alle Versuche, die Erfahrungen mit Schweinechondrozyten 1:1 auf das humane System zu übertragen, führten bisher nicht zum gewünschten Erfolg. So reicht insbesondere der mit dedifferenzierten Schweinechondrozyten erprobte synergistische Effekt der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$  nicht aus, dedifferenzierten humanen Chondrozyten die Fähigkeit primärer Chondrozyten zur Bildung hyalinen Knorpels zurückzugeben. In *High-Density*-Kulturen aus solchen Zellen gebildete Knorpel-Pellets blieben kleiner und enthielten neben Kollagen Typ II stets auch zu hohe Anteile des unerwünschten, für die Bildung von minderwertigem Faserknorpel verantwortlichen Kollagens Typ I. Die Idee, mit PDGF-BB die Wirkung eines weiteren Zytokins zu nutzen, geht auf die Beobachtung in der Arbeitsgruppe zurück, dass in der Expansionsphase mit PDGF-BB vorbehandelte Chondrozyten ein erhöhtes Chondrogenese-Potential während der späteren *High-Density*-Kultur zeigten (Feyerabend 2003). Dies führte zu der Frage, ob dieser permissive Effekt von PDGF-BB auf der Unterstützung der Redifferenzierung der Chondrozyten beruhte. Eine Antwort wurde von den in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Untersuchungen über die Wirkung von PDGF-BB auf dedifferenzierte humane Chondrozyten in der Alginatephase erwartet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

**Phosphate buffered saline, PBS**

Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

**1,9-Dimethyl-Methylenblau-Chlorid, DMBB**

Serva Feinbiochemica GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

**5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Acrylamidlösung**

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

**Agarose**

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

**Alginat**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**alkalische Phosphatase, AP**

Streptavidin-markiert, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

**Ammoniumperoxodisulfat, APS**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Anti-Kollagen I und II (Ziege)**

Southern Biotechnology Ass. Inc., Birmingham, USA

**Ascorbinsäure-2-phosphat**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Basic fibroblast growth factor, bFGF**

Cell Concepts, Umkirch, Deutschland

**Bisbenzimid**

Serva Feinbiochemica, GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

**Casein**

I-Block Tropix, Bedford, CA, USA

**Chondroitinsulfat C**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Collagenase**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Cystein**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Diethanolamin/HCL**

Tropix, Bedford, CA, USA

**Dimethylformamid**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Dithioreitol**

Serva Feinbiochemica GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

**Dulbecco's modified eagle medium, DMEM**

Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

**Dimethylsulfoxid, DMSO**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Epidermal growth factor, EGF**

RD Systems, Wiesbaden, Deutschland

**Essigsäure**

Serva Feinbiochemica GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

**Fötale Kälberserum, FKS**

PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

**Guanidinhydrochlorid**

6 M in 0,2 M TRIS pH 8,5; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Harnstoff 6 M**

Serva Feinbiochemica GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

**2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES**

pH 7,4 , VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Hyaluronidase**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Insulin-like growth factor, IGF-I**

Cell Concepts, Umkirch, Deutschland

**Jodacetamid-Lösung, JAA**

0,1 M Jodacetamid in DMSO, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Kalbsthymus**

F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz

**Kaninchen-anti-Ziege-IgG**

Southern Biotechnology Ass. Inc., Birmingham, USA

**Kollagenstandards I und II**

Southern Biotechnology Ass. Inc., Birmingham, USA

**Magnesiumchlorid**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Mercaptoethanol**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Methylrot Lösung**

2 Methylrot in 0,6 Essigsäure, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED**

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

**Natriumazid**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Papain**

F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz

**Platelet-derived growth factor, PDGF-BB**

RD-Systems, Wiesbaden, Deutschland

**Phenylmethylsulfonfluorid, PMSF**

F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz

**p-Nitrotetrazolium-Blau**

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

**Streptomycin/Penicillin**

Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

**Transforming growth factor, TGF- $\beta_1$**   
RD-Systems, Wiesbaden, Deutschland

**Trypsin**  
mit EDTA, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

**Tween 20**  
Serva Feinbiochemica GmbH Co., Heidelberg, Deutschland

### **3.1.2 Geräte und Software**

**Brutschrank Cytoperm 2**  
Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

**Zentrifuge Hettich Rotanta/TRC**  
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

**Zellzähler CASY 1**  
CASY 1 Zellzähler, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

**Mikroskop Olympus CK2**  
Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

**Thermomixer 5436**  
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Photometer Victor 1420 Multilabelcounter**  
Wallac Distribution GmbH, Freiburg, Deutschland

**MS Excel**  
Microsoft, Deutschland, Lizenz PD Dr. Adamietz

**SigmaPlot**  
Systat Software Inc. Richmond, CA, USA, Lizenz PD Dr. Adamietz

**StatView**  
SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, Lizenz Dr. Laudahn

**Layout, Bildbearbeitung und Satz**  
 $\text{\LaTeX}$  Satzsystem und GIMP, Programmpakete unter der GNU Public License

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### T-75, T125-Flaschen

Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

#### CryoVials

Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

#### Qualifreeze

Qualifreeze, Nunc GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

#### Falcon Röhrchen

(50ml, 15ml) Becton-Dickinson Labware, Franklin Lake, NJ, USA

#### Monovetten

S-Monovette, Sarstedt AG Co, Nürnberg, Deutschland

#### Eppendorf Tubes

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

#### 96, 6 und 12 Well Platten

Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.4 Ansätze

#### 1-fach Waschpuffer

150 mM NaCl, 25 mM HEPES, aqua dest. ad 1000ml

#### 2-fach Waschpuffer

300 mM NaCl, 50 mM HEPES aqua dest. ad 1000ml

#### Calciumpuffer

100 mM  $CaCl^2$ , 25 mM HEPES (pH 7,4), aqua dest. ad 1000ml

#### Citratpuffer

150 mM NaCl, 55 mM tri-Natriumcitrat, 25 mM HEPES in aqua dest.

#### DNA Puffer Lösung

2,5 M NaCl, 19 mM Natriumcitrat pH 7

#### DNA Bestimmungs Puffer

2 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat pH 7

#### Papain-Lösung

500  $\mu$ l 0,1M  $NaH_2PO_4$ /005 EDTA, pH 6 , 5  $\mu$ l Mercaptoethanol, 2,5  $\mu$ l Papain  
10  $\frac{mg}{ml}$

**Blotting Puffer**

0,5% Casein, 0,1% Tween 20 in PBS und 0,02% Natrimazid in aqua dest.

**Blottingwaschpuffer**

0,2% Casein, 0,1% Tween 20 und 0,02% Natriumazid in aqua dest.

**Substratpuffer für alkalische Phosphatase**

66 $\mu$ l p-Nitrotetrazolium-Blau 50 $\frac{mg}{ml}$  in 70% Dimethylformamid und 33 $\mu$ l 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz 50 $\frac{mg}{ml}$ , gelöst in 100% Dimethylformamid.

**Medium zur Proliferation**

DMEM mit 10% FKS, 0,28 mM Ascorbinsäure-2-phosphat 1mM Cystein, 1% Penicillin/Streptomycin, 10 $\frac{ng}{ml}$  FGF, 10 $\frac{ng}{ml}$  EGF

**Standardmedium**

DMEM mit 10% Humanserum, 0,28 mM Ascorbinsäure-2-phosphat 1mM Cystein, 1% Penicillin/Streptomycin und beschriebene Zytokine

**Medium zur Kryokonservierung**

DMEM, 20% FKS, 10% DMSO, 1% Penicillin/Streptomycin

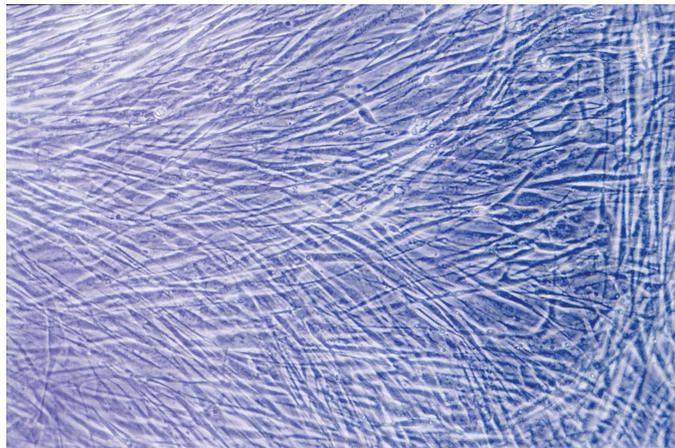
## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Gewinnung und Kultivierung der isolierten Chondrozyten

Die humanen Gelenkchondrocyten stammen von Spendern des Instituts für Pathologie und Rechtsmedizin (Prof. Dr. Püschel). Hierzu wurden innerhalb von 24 Stunden *post mortem* die Kniegelenke arthrotomiert und Gelenkknorpel von der tibialen und femoralen Gelenkfläche entnommen. Die in den Versuchen eingesetzten Zellen entstammen ausschließlich von Spender HCh 8 (m, 6a). Die gewonnenen Knorpelstücke wurden nun innerhalb von zwei Stunden in PBS überführt. Zur Aufbereitung erfolgte zunächst die Zerkleinerung und das Lösen von Geweberesten mit dem Skalpell, dann die Überführung auf ein Sieb in eine Verdauungskammer und Inkubation bei 37°C im Brutschrank mit 50ml Hyaluronidase unter Rühren über 25 Minuten. Die nun angedauten Knorpelstücke wurden dann ein zweites Mal inkubiert bei 37°C mit 50ml Trypsin/EDTA über 45 Minuten, anschließend 5 minütiges Waschen mit 50ml DMEM und 10% fötalem Kälberserum, dann Verwerfen der Waschlösung. Zugabe von 50ml Collagenase und Inkubation (37°C, 120 Minuten) unter Rühren. Dann erneute Zugabe von 50ml Hyaluronidase und Inkubation (37°C, 25 Minuten, Rühren). Zweite Inkubation mit 50ml Collagenase über 12 Stunden bei 37°C und Rühren, dann Inkubation über 24 Stunden mit 25ml Collagenase und 25ml Hyaluronidase bei 37°C und Rühren. Die so gewonnene Lösung wurde über 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert, die Zellen gezählt. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von  $10^4$  Zellen /  $cm^2$  in T-75-Flaschen ausgesät.

### 3.2.2 Proliferation

Die nach der Gewinnung ausgesäten Zellen wurden zunächst stark proliferiert, da die aus dem Knorpel gewonnene Zellzahl mit knapp  $10^6$  Zellen nicht ausreicht, um eine Versuchsserie durchzuführen. Die Proliferation erfolgte in T-75 und T-125 Flaschen, ein Mediumwechsel erfolgte zwei- bis dreitägig unter täglicher Sichtkontrolle bis zur Konfluenz der Zellen als Monolayer mit dem Proliferationsmedium aus Abschnitt 3.1.4 mit bFGF und EGF. Zum Splitten der Kulturen wurden die Flaschen zunächst von Medium befreit, anschließend zweimalig mit PBS gewaschen. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte durch Zugabe von Trypsin/EDTA Lösung, 3ml bei T-75, 5ml bei T-175 Flaschen. Die Inkubationszeit betrug zwischen 90 Sekunden und 4 Minuten, das Ablösen wurde durch Klopfen beschleunigt und lichtmikroskopisch kontrolliert, Stoppen der Reaktion durch Zugabe von DMEM mit 10% FKS. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 1500 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit serumhaltigem Medium resuspendiert, die Zellen bei einer Dichte von  $10^4$  Zellen /  $cm^2$  erneut ausgesät. Die in den Versuchen eingesetzten Zellen sind alle bis zur achten Passage proliferiert worden, um dann entsprechend des Versuchsaufbaus weiter verwendet zu werden.



**Abbildung 3.1:** Spindelförmige (*fibroblast-like*) Morphologie kultivierter Chondrozyten in Konfluenz (Achte Passage, Phasen-Kontrast-Mikroskop, 200x vergrößert).

### 3.2.3 Kryokonservierung

Nach der Proliferation bis zur dritten Passage wurden die Zellen nach Abzentrifugieren über 5 Minuten bei 1500 U/min mit Medium zu einer Konzentration von  $10^5$  bzw.  $10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Vials in einem gleichmäßige Abkühlphase von  $1 \frac{C}{h}$  gewährleistendem Gefäß (Qualifreeze) bis auf  $-70^{\circ}C$  abgekühlt, anschließend bei ebenfalls  $-70^{\circ}C$  gelagert. Das Auftauen erfolgte bei  $37^{\circ}C$  im Wasserbad, nach Verflüssigen der Zellsuspension erfolgte die sofortige Aussaat.

### 3.2.4 Humanserum

Während der Proliferationsphase wurde als Medium ausschließlich DMEM mit 10% FKS verwendet. Um die Chondrozyten in der Alginatphase und während der Chondrogenese zu versorgen, wurde DMEM mit 10% Humanserum verwandt. Das Humanserum wurde durch Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin gewonnen. Hierzu wurden auf Basis der Spenderdatenbank des Instituts Spender, welche für eine Blutspende auf Grund der transfusionmedizinischen Ausschlusskriterien nicht zur Verfügung standen, nach einer persönlichen Aufklärung für eine freiwillige wissenschaftliche Spende vorgeladen. Es erfolgte pro Spender eine Entnahme von 300 bis 500ml Vollblut in einen Aderlassbeutel ohne Zusätze. Gleichzeitig erfolgte die Abnahme eines Routinelabors für die übliche Infektionsserologie. Das Vollblut wurde anschließend in 50ml Falcon-Röhrchen umgefüllt. Diese waren mit gerinnungsinduzierendem Aluminium-Silikat aus jeweils 5 Monovetten Röhrchen befüllt. Anschließend abzentrifugieren bei 4500 U/min über 10 Minuten, das überstehende

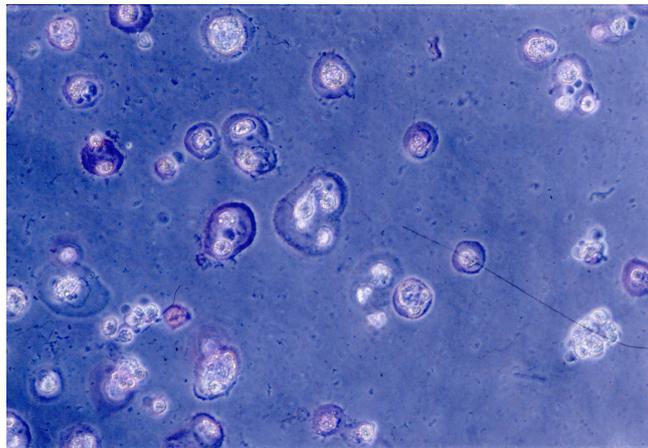
Serum wurde erneut in 50ml Falcons überführt, nach einer zweiten Zentrifugation bei 4500 U/min für 10 Minuten wurde das Serum in 50ml Falcons aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Das Humanserum wurde nicht gepoolt, nach Möglichkeit wurde jeder Versuch mit dem Serum nur eines Spenders durchgeführt.

### **3.2.5 Erzeugung der Alginat-Beads**

Zur Einbettung der Chondrozyten in Alginat wurden die Chondrozyten aus den Kulturflaschen nach Trypsinierung (siehe 3.2.2) abzentrifugiert und gezählt. Danach Waschen mit 1-fach Waschpuffer-Lösung. Anschließend erneutes Zentrifugieren bei 1500 U/min. Eine Alginat Stammlösung wurde durch Ansetzen von 2,4% Alginat mit 2-fach Waschpufferlösung erzeugt. In dieser nun 1,2% Alginatlösung wurden die Chondrozyten mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml suspendiert. Über eine Tropfvorrichtung, bestehend aus einem Ständer, einer 20ml Spritze mit Auslass über einen Gummischlauch mit Schlauchklemme über eine Metallkanüle, wurde die so eingestellte Alginat-Chondrozyten-Suspension tropfenweise in einen Kolben appliziert. In diesem befand sich Calcium-Puffer. Das Calcium führt zu einer Polymerisation des Alginats, so daß Alginat-Beads entstehen. Diese härteten nach dem Tropfen für 25 Minuten im Puffer aus. Anschließend wurde der Puffer dekantiert, die Beads zweimalig mit 1-fach Waschpuffer gewaschen und je nach Versuch entsprechendes Medium hinzugefügt. Bis zum Ende der Redifferenzierungsphase erfolgte der Mediumwechsel mit Standardmedium nach Abschnitt 3.1.4 unter Zusatz der in den Versuchen angegebenen Zytokine in zwei- bis dreitägigem Abstand. Über den eingesetzten Brutschrank wurde je nach Versuch ein Sauerstoffanteil von 5% bzw. 20% bei 5% CO<sub>2</sub> eingestellt, die genaue Angabe ist den Versuchen zu entnehmen.

### **3.2.6 Elution aus den Alginat-Beads**

Nach Ende der Redifferenzierungsphase in Alginat wurde zunächst das Medium abgezogen, anschließend gewaschen mit 1-fach Waschpuffer. In dem nun hinzugefügtem Citratpuffer in fünffachem Volumen zu den Beads lösten sich diese, inkubiert bei 37°C, unter gleichmäßigem Schütteln über 25-40 Minuten auf. Die entstandene Suspension wurde mit 1000 U/min abzentrifugiert, mit 1-fach Waschpuffer gewaschen und abgezählt. Es erfolgte eine Kontrolle nach Anfärben mit 1,9-Dimethyl-Methylenblau-Chlorid unter dem Phasenkontrastmikroskop, hierbei färbt sich auf Grund ihres Gehaltes an Glykosaminoglykanen die von den Chondrozyten gebildete perizelluläre Matrix blau an, so daß diese als sogenannte Pseudochondrone erscheinen (siehe Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** Pseudochondrone, Färbung mit DMMB (Phasen-Kontrast-Mikroskop, 200x vergrößert).

### 3.2.7 Chondrogenese nach der Alginatphase

Die Verarbeitung der Chondrozyten bzw. dann Pseudochondrone erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Elution aus Alginat. Die Chondrozyten wurden mit Medium resuspendiert, gezählt,  $10^6$  Zellen pro 50ml Falcon Röhren aliquotiert und anschließend abzentrifugiert mit 1000 U/min. Anschließend Zugabe von 3ml Medium. Nach zwei Tagen wurden die Pellets auf 6-Well-Plates überführt, diese waren mit Agarose beschichtet. Der Mediumwechsel mit Standardmedium (3ml pro Well; siehe Abschnitt 3.1.4 ) erfolgte alle zwei bis drei Tage. Der Zusatz an Zytokinen ist dem jeweiligen Versuch zu entnehmen, der Brutschrank wurde auf 20%  $O_2$  und 5%  $CO_2$  eingestellt. Nach 21 Tagen wurden die Pellets mit 1-fach Waschlösung gewaschen und vor der Analytik in Eppendorf-Tubes bei  $-30^\circ C$  eingefroren.

### 3.2.8 Pellets aus proliferierten Zellen (Direkte Chondrogenese)

Zur Erzeugung von Knorpel pellets aus Chondrozyten ohne vorausgehende Redifferenzierungsphase wurden diese nach der achten Passage trypsinisiert, gezählt und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml mit 1-fach Waschlösung eingestellt. Es wurden dann  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen in 50ml Falcon-Röhren mit 1000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgezogen und 3ml Standardmedium supplementiert. Nach zwei Tagen der Aggregation wurden die Pellets in agarosebeschichtete 6-Well-Platten überführt, hier erfolgte der zwei bis dreitägige Mediumwechsel bis zum Ende des Versuches nach 21 Tagen. Der Brutschrank wurde auf eine  $O_2$  Konzentration von 20% bei 5%  $CO_2$  eingestellt. Die zugesetzten Zytokine sind dem jeweiligen Versuch zu entnehmen. Nach Ende des Versuches wurden die Pellets mit 1-fach Waschlösung gewaschen und bis zur Analytik in Eppendorf-Tubes eingefroren.

### 3.2.9 Zytokine

Während der Redifferenzierung in Alginat und bei der Chondrogenese – sowohl aus Chondrozyten, wie auch aus Pseudochondronen – wurden dem Standard-Medium Zytokine in den jeweiligen bei den Versuchen angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Im Einzelnen handelte es sich um die Isoformen von *Platelet-derived growth factor* (PDGF-BB), *Transforming growth factor* (TGF- $\beta_1$ ) und *Insulin-like growth factor - I* (IGF-I).

### 3.2.10 Analytik

#### DNA-Bestimmung

Zur Bestimmung des DNA Gehalts der Proben wurden diese mit Papain Lösung über Nacht im Schüttel-Heizblock bei 60°C verdaut. 50 $\mu$ l der Probe wurden im Verhältnis 1:5 mit DNA-Pufferlösung verdünnt. Die DNA Analyse erfolgte fluorimetrisch in 96-Well-Platten. Hierzu wurden alle Wells mit 100 $\mu$ l DNA-Bestimmungspufferlösung beschickt, in die erste Zeile dann 100 $\mu$ l Probe pipettiert, anschließend erfolgte das zeilenweise Anfertigen einer Verdünnungsreihe unter Verwerfung des Restes nach der letzten Zeile. Vor der Messung mit einem computergestützten Photometer Zugabe von 100 $\mu$ l Bisbenzimid-Lösung pro Well und Inkubation im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Als DNA Standard diente eine verdünnte Stammlösung aus Kalbsthymus DNA. Die Anregung bei der fluorimetrischen Messung wurde mit einer Wellenlänge von 355nm, die Extinktionsmessung bei 460nm durchgeführt. Die Messergebnisse dieser automatisierten Doppelbestimmung wurden in MS Excel transferiert und hier über ein Visual-Basic-Script (PD Dr. Adamietz) eine Regressionsanalyse durchgeführt.

#### Glykosaminoglykanbestimmung

Die Bestimmung der Glykosaminoglykane erfolgte in 96-Well-Platten. In diese wurde zunächst 100 $\mu$ l/Well *aqua dest.* vorgelegt. Die erste Zeile wurde dann mit 100 $\mu$ l der wie in Abschnitt 3.2.10 verdauten Probe beschickt, anschließend Pipettieren einer Verdünnungsreihe. Als Standard diente Chondroitinsulfat (500 $\frac{ng}{ml}$ ). Anschließend wurde jedes Well mit 150 $\mu$ l Dimethylmethylenblau-Lösung beschickt und über 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 530nm, die Auswertung der Daten erfolgte analog der DNA Messung.

### 3.2.11 Westernblotting

#### Probenaufbereitung

Die in den Eppendorf-Tubes befindlichen Proben wurden zunächst mit 500 $\mu$ l Guanidinhydrochlorid 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 $\mu$ l Dithioereitol und weitere Inkubation über 30 Minuten. Dann Zugabe von 50 $\mu$ l 10%iger Essigsäure und 50 $\mu$ l Jodacetamid-Lösung (JAA). Vor dem Blotten wurden die Proben durch Dialysieren entsalzt. Als Dialyselösung diente 500ml 6M Harnstoff, dem jeweils vor Gebrauch je 2,5ml einer 0,1M Phenylmethylsulfonfluorid-Lösung (PMSF) in DMSO und 1ml einer 0,1M JAA-Lösung in DMSO zugefügt wurde. Die dialysierte Probe wurde anschließend entnommen und mit 10 $\mu$ l Methylrot-Lösung versetzt.

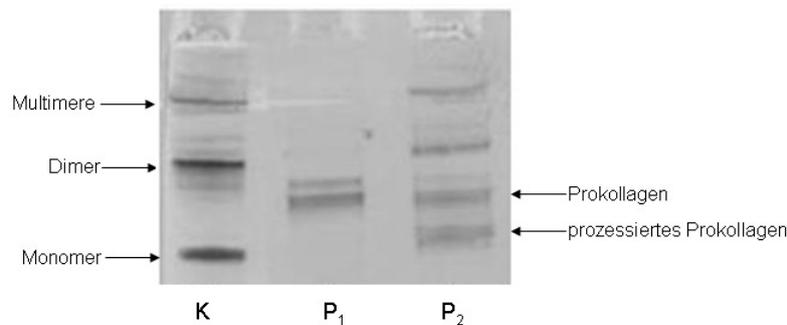
#### Herstellung der Gele

Zur Herstellung des Trenngels wurden 10M Harnstoff (60ml), *aqua dest.* (17,5 ml), Eisessig (7 ml) und 50% Acrylamidlösung entgast. Die Polymerisation wurde dann mit 750 $\mu$ l 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) und 750 $\mu$ l TEMED gestartet, das Gel mit 500 $\mu$ l 0,6% Essigsäure überschichtet, Polymerisation über 60 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Herstellung des Sammelgels wurden 31,6ml Harnstoff, 13,4ml *aqua dest.*, 300 $\mu$ l Eisessig, 4ml Acrylamid, 350 $\mu$ l APS und 350 $\mu$ l TEMED verwendet, welche über 12 Stunden polymerisierten. Eine Reinigung der Gele fand im Anschluss an die Polymerisation in der Elektrophoresekammer bei 100V über 60 Minuten in Gegenwart von 0,6% Essigsäurelösung statt.

#### Elektrophorese

Zur Elektrophorese wurden die Taschen des Gels mit jeweils 10 $\mu$ l der entsalzten Probe beschickt. Bei jedem Blot liefen zwei Kollagenstandards mit. Nach dem Befüllen mit den Proben Anlegen einer Spannung von zunächst 100V über 30 Minuten, dann 200V über 150 Minuten. Blotting in 0,6% Essigsäurelösung über 60 Minuten bei 80V. Nach dem Blotting zunächst Waschen mit PBS, anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur über 60 Minuten in Blottingpuffer. Als primärer Antikörper wurde Anti-Kollagen I bzw. II von der Ziege benutzt, welcher über Nacht inkubierte. Vor der Aufbringung des sekundären Antikörpers erfolgte das Waschen der Membran mit Waschpuffer. Inkubation des sekundären Antikörpers über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Hierzu wurde Kaninchen-anti-Ziege-IgG verwandt. Dann erneutes Waschen mit Waschpuffer (s.o.) über 5 Minuten und Einlage der Membran für 30 Minuten in Lösung mit alkalischer Phosphatase (AP) bei Raumtemperatur. Vor der Färbung erfolgten zunächst fünf Reinigungs- bzw. Neutralisationschritte über 5 Minuten bei Raumtemperatur, zunächst dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, anschließend zweimaliges Waschen mit Substratpuffer für AP. Abschließend

Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur in Substratlösung für AP. Zum Schluss Waschen der Blotmembranen in *aqua dest.* über 5 Minuten und Trocknen bei Raumtemperatur. Das Ergebnis sind Blots wie in Abb. 3.3 dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Typisches Bandenmuster eines Immunoblots, K= Kollagenstandard (Kollagen I), P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> sind Proben eines Ausgangswertes vor der Alginatphase (P<sub>1</sub>) und einer Kontrolle (P<sub>2</sub>).

Der Blot wurde mit Anti-Kollagen I angefärbt. Es lassen sich hierbei die Banden des Kollagen Monomers und Dimers beim Standard gut unterscheiden. Bei den hier mitgelaufenen Proben ist deutlich der Nachweis von Prokollagen und dem prozessierten, damit kleineren und somit weiter von der Startposition entfernteren Prokollagen sichtbar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Bandenmuster von Degradationsprodukten unterhalb des Monomers bei der Nachbearbeitung meist entfernt. Zu den an den jeweiligen Tagen durchgeführten Elektrophoresen sind im Ergebnisteil die Immunoblots der Standards geschnitten worden, pro durchgeführter Analytik immer ein Standard. Da die Gele mit sieben Fächern bei zwei Standards immer nur Platz für fünf Proben haben, befinden sich bei einigen an einem Tag durchgeführten Analysen die Kontrollen nicht auf dem gleichen Gel wie die Probe. Um Proben vergleichen zu können, werden daher immer die auf dem Gel mitgelaufenen Standards dargestellt. Bei den Versuchen 4.1.2, 4.1.3 und 4.1.4 führt dies zu den gleichen Immunoblots bei der Kontrolle.

### 3.2.12 Verarbeitung der Immunoblots

Die in dieser Arbeit gezeigten Blots wurden mit einem handelsüblichen Flachbettscanner bei 600dpi gescannt. In einer Bildnachverarbeitung wurden gegebenenfalls die Kollagenstandards neben die entsprechenden Proben geschnitten, um eine bessere Übersicht zu erreichen. Eine digitale Nachbearbeitung erfolgte zur Optimierung des Ausdrucks auf Papier.

### **3.2.13 Statistik**

Die Stichprobenanzahl (n) betrug mindestens 5. Die statistische Auswertung der GAG/DNA Werte erfolgte mit dem Programm StatView 5.0. Zur Beschreibung der kontinuierlichen Variablen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Bei den unabhängigen Stichproben wurde zur Bestimmung der Signifikanz von Mittelwertunterschieden bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Bei festgestellter Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der Paarvergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Als graphische Darstellung wurde eine Balkengraphik gewählt, der Fehlerbalken ist die Standardabweichung vom Mittelwert. Die Graphen wurden mit dem Programm SigmaPlot erzeugt.

## 4 Ergebnisse

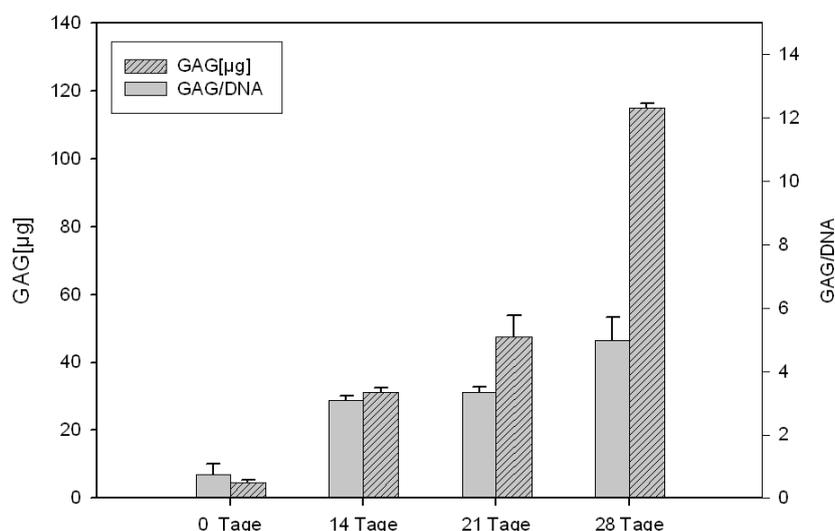
### 4.1 Der Einsatz der Alginatkultur zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Zytokin-Kombinationen auf die Redifferenzierung dedifferenzierter humaner Chondrozyten

Frisch isolierte humane Chondrozyten verlieren ihren differenzierten Phänotyp bei Vermehrung *in vitro* durch konventionelle Monolayer-Technologie mit fortschreitender Passagierung. Nach sechs bis acht Passagen sind die verbliebenen differenzierten Zellen praktisch nicht mehr nachweisbar (Feyerabend 2003). Äußerlich erkennbar ist diese Veränderung durch eine geänderte Morphologie der Zellen hin zu einer fibroblastoiden Struktur, wie in Abb. 3.1 dargestellt. Zur biochemischen Charakterisierung wird der Verlust zur Bildung knorpelspezifischer Glykosaminoglykane (GAG), sowie die Expression des für hyalinen Knorpel typischen Kollagens Typ II herangezogen. Bei Schweinechondrozyten gelingt die Wiedererlangung des differenzierten Phänotyps während einer mehrwöchigen Behandlung der Zellen in einer Alginat-Kultur unter der synergistischen Wirkung der Zytokine IGF-I und TGF- $\beta_1$ . Dabei erfüllt der reversible Einschluss der Zellen in ein Gel zwei Aufgaben: Einerseits schirmt er die Zellen vor den mitogen wirkenden Kontakten mit den Wänden der Zellkulturschalen ab und andererseits verhindert er die unerwünschte vorzeitige Induktion der Chondrogenese durch Zell-Zell-Kontakte. Für die folgenden Untersuchungen zur redifferenzierenden Wirkung verschiedener Zytokin-Kombinationen wurden in Alginatgel eingeschlossene humane Chondrozyten nach achtfacher Passagierung eingesetzt.

#### 4.1.1 Der Einfluss einer Kombination von IGF-I und TGF- $\beta_1$ auf die Redifferenzierung von humanen Chondrozyten

Dedifferenzierte humane Chondrozyten wurden nach achtfacher Passagierung zur *in vitro* Vermehrung in ein Alginatgel eingebettet und für 28 Tage in Gegenwart der beiden Zytokine IGF-I und TGF- $\beta_1$  kultiviert. Dabei wurde gleichzeitig der Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase in diesem und allen folgenden Experimenten auf 5%  $O_2$  reduziert. Um den Effekt auf die Redifferenzierung zu bestimmen, wurden die gebildeten Pseudochondrone nach jeweils 0, 14, 21 und 28 Tagen zur Analyse der Bildung von GAG und Kollagen isoliert.

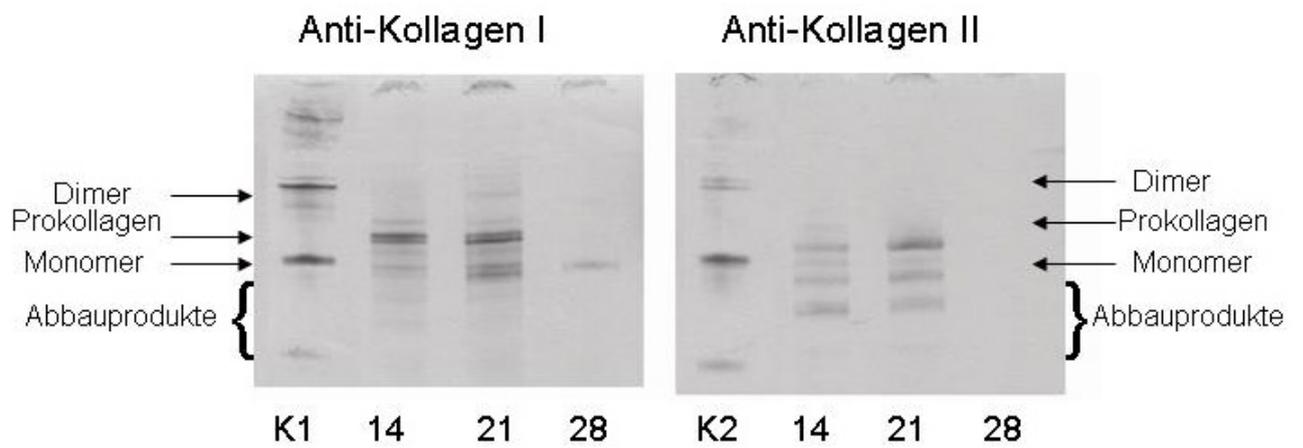
Wie in Abbildung 4.1 erkennbar, steigt der GAG-Gehalt mit zunehmender Kultur-



**Abbildung 4.1:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 7,14 und 28 Tagen einer Redifferenzierung in Alginat.

dauer deutlich an. Dabei scheint die letzte Woche einen besonders großen Zugewinn zu bringen. Allerdings betrifft dieser Effekt vor allem den Anstieg der absoluten GAG-Menge, nicht aber die Syntheseleistung der einzelnen Zelle. Für letzteres ist der sogenannte GAG-DNA-Quotient (GDQ) ein geeignetes Maß. Die geringere Zunahme des GDQ lässt darauf schließen, dass die stärkere GAG-Bildung besonders in der vierten Woche auf einer parallel einsetzenden späten Zellvermehrung beruht.

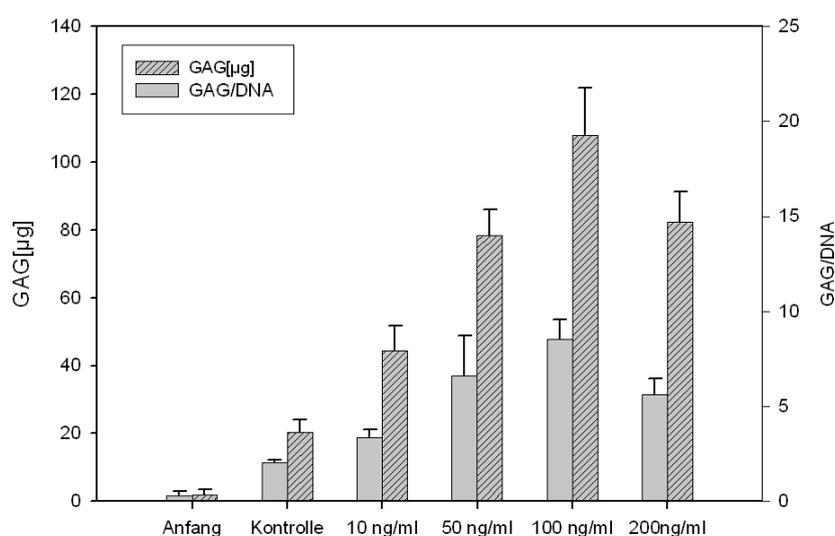
Mit Hilfe der semiquantitativen Immunoblot-Analyse (Abb. 4.2) wird die erwartete Bildung von Prokollagen für beide Kollagentypen beobachtet, eine Zeitabhängigkeit allerdings nur für den Typ II. Für die am längsten kultivierten Proben fällt der Test negativ aus. Dies kann die Folge eines hydrolytischen Abbaus sein. Auch eine fehlerhafte Analytik kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Am wahrscheinlichsten ist die begrenzte Haltbarkeit der Alginat-Beads, die zu einem Zellverlust durch mechanische Beanspruchung beim wiederholten Mediumwechsel führt. Um diesen möglicherweise rein methodischen Fehler künftig zu vermeiden, wurde die Dauer der Alginatphase für die folgenden Untersuchungen auf 21 Tage begrenzt. Damit wird gleichzeitig der Einfluss der in der vierten Woche stärker einsetzenden Zellvermehrung auf das Ergebnis reduziert.



**Abbildung 4.2:** Kollagen Blot von (Pseudo) Chondronen nach der Alginatephase. K1= Kollagen Typ I, K2= Kollagen Typ II. 14,21,28= Laufzeit in Tagen. Links Färbung mit Anti-Kollagen I, rechts mit Anti-Kollagen II.

### 4.1.2 Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von IGF-I

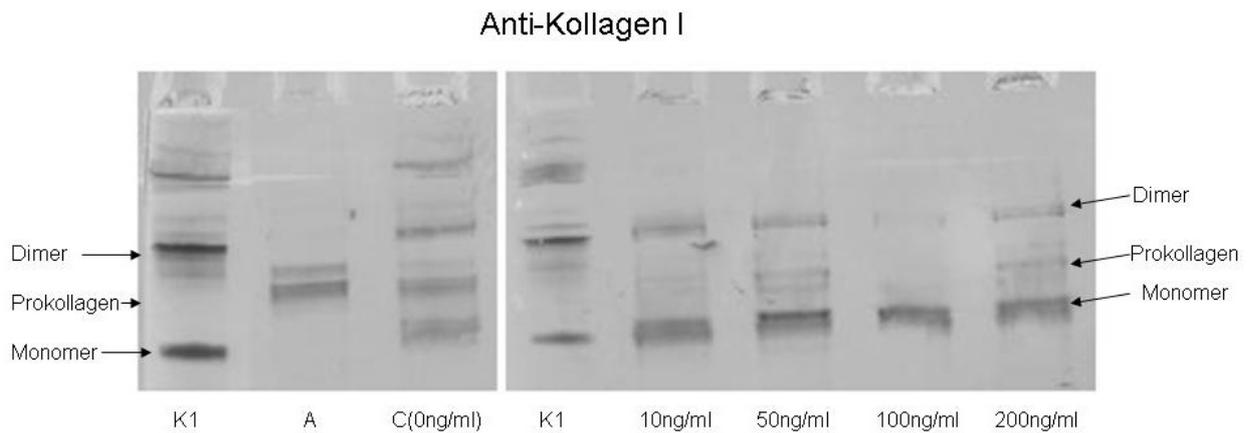
Um die Abhängigkeit der Redifferenzierung von IGF-I zu überprüfen, wurden dedifferenzierte humane Chondrozyten in Alginat eingeschlossen und für 21 Tage bei Zytokin-Konzentrationen von 0 bis  $200 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  kultiviert. Das in Abbildung 4.3 dargestellte Ergebnis lässt erkennen, dass die GAG-Syntheserate bis zu einer Konzentration von  $100 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF-I dosisabhängig ansteigt. Dabei liegt das Ergebnis der niedrigsten Konzentration ( $10 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF-I) schon signifikant höher als die Kontrolle ohne Zusatz des Zytokins. Der GDQ zeigt eine ähnliche Entwicklung, was darauf hindeutet, dass Zellvermehrung und Zellverluste während der 21-tägigen Kultivierung nicht störend in Erscheinung treten. Nicht in dieses Bild zu passen scheint das Ergebnis, welches mit der höchsten Zytokin-Konzentration ( $200 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF-I) ermittelt wurde. Denn im Durchschnitt aller Analysen wurde hier ein Abfall beobachtet. Zwar ist denkbar, dass schon bei  $100 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  ein Sättigungswert erreicht wurde, doch erklärt dies keine Abnahme sowohl der absoluten wie der relativen GAG-Menge (GDQ). Eine plausible Erklärung konnte nicht gefunden werden.



**Abbildung 4.3:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat unter 5% Sauerstoff, Standardmedium mit Zusatz von IGF-I in  $\frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ , Kontrolle=  $0 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF.

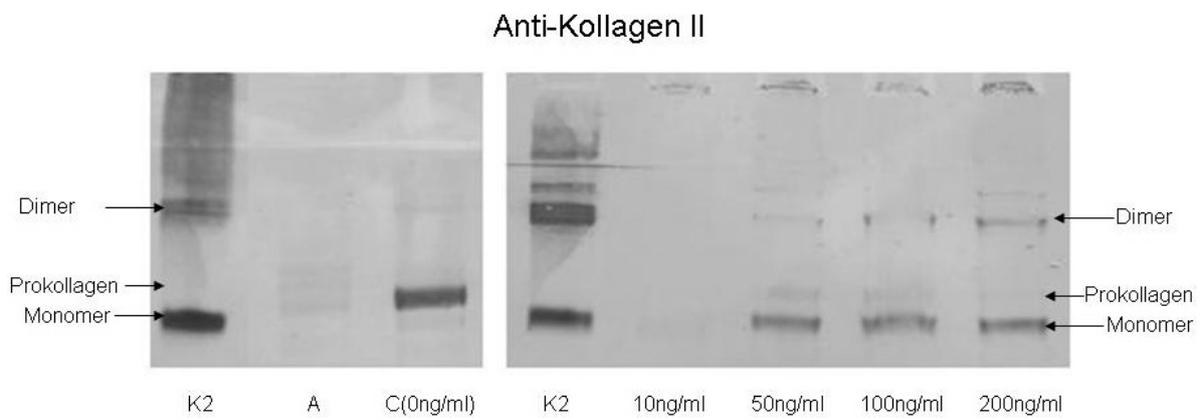
Die Analyse der Kollagenbildung mit Hilfe des Immuno-Blot-Verfahrens (Abb. 4.4 und 4.5) lieferte für die beiden Kollagentypen leicht unterschiedliche Ergebnisse. Während Kollagen Typ I praktisch unabhängig von der Zytokin-Zugabe gebildet zu werden scheint, vermögen die Zellen in Abwesenheit und bei zu niedrigen Konzentrationen von IGF-I ( $10 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ ) keine nachweisbaren Mengen von Kollagen Typ II zu bilden.

Ferner ist ein Anstieg über die bei  $50 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF-I beobachtete Kollagenbildungsrate bei weiterer Erhöhung auf  $100$  und  $200 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  nicht zu beobachten. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass sowohl beim Kollagen Typ I wie auch beim Typ II in Gegenwart dieses Zytokins stets das fertige Kollagen als Monomer mit geringen Anteilen des Dimers gebildet wird. Nur zu Beginn der Kultivierung wird eine geringe Menge des Kollagens Typ I als Prokollagen nachgewiesen (A in Abb. 4.4).



**Abbildung 4.4:** Einfluss der IGF-I Konzentration auf die Kollagensynthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. K1=Kollagenstandard Typ 1, C=Kontrolle mit  $0 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  IGF, A=Anfang. IGF-I in  $\frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ .

Zusammengefasst führt die Supplementierung des Kulturmediums mit IGF-I als einzigem Zytokin bei niedrigen Konzentrationen zu einer dosisabhängigen Synthese von Glykosaminoglykanen und in geringerem Maße auch zur Stimulierung der Bildung von Kollagen Typ II. Eine nennenswerte Beeinflussung der Zellproliferation wird nicht beobachtet.

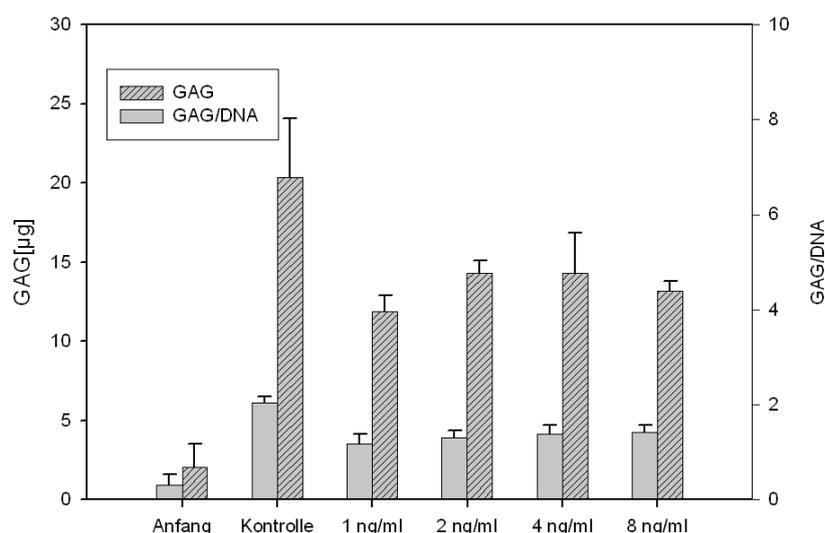


**Abbildung 4.5:** Einfluss der IGF-I Konzentration auf die Kollagensynthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. K2=Kollagenstandard Typ 2, C=Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  IGF, A=Anfang. IGF-I in  $\frac{ng}{ml}$ .

### 4.1.3 Der Einfluss von TGF- $\beta_1$ auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten

Um die Möglichkeit der Redifferenzierung mit Hilfe von TGF- $\beta_1$  zu überprüfen, wurden *in vitro* über acht Passagen vermehrte humane Chondrozyten in Alginatgel eingeschlossen und in Gegenwart steigender Konzentrationen von TGF- $\beta_1$  für 21 Tage kultiviert. Auch hier wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase wieder bei 5% O<sub>2</sub> gehalten.

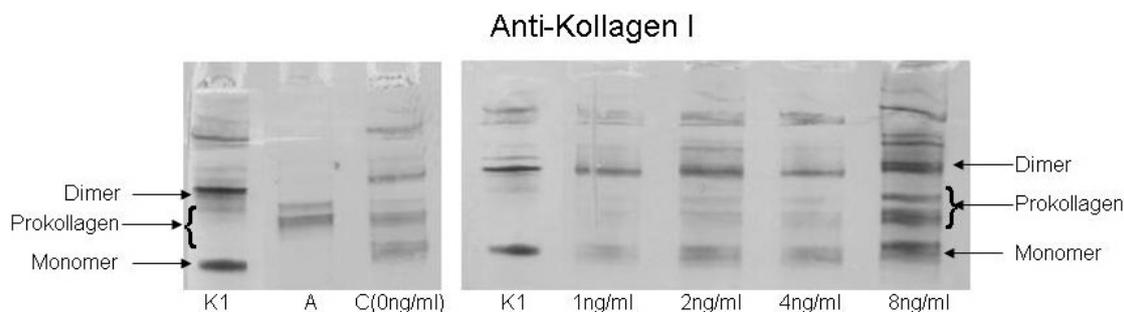
Die Auswertung des GAG- und DNA-Gehalts der Proben ohne Zytokinzusatz (Kontrolle) ergab den höchsten Anstieg während der 21-tägigen Kultivierung. Demgegenüber scheint die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  deutlich hemmend zu wirken. Weiterhin ist auch bemerkenswert, dass im Rahmen der gewählten Konzentrationen zwischen 1 und 8  $\frac{ng}{ml}$  TGF- $\beta_1$  keine Dosisabhängigkeit erkennbar ist (Abb. 4.6).



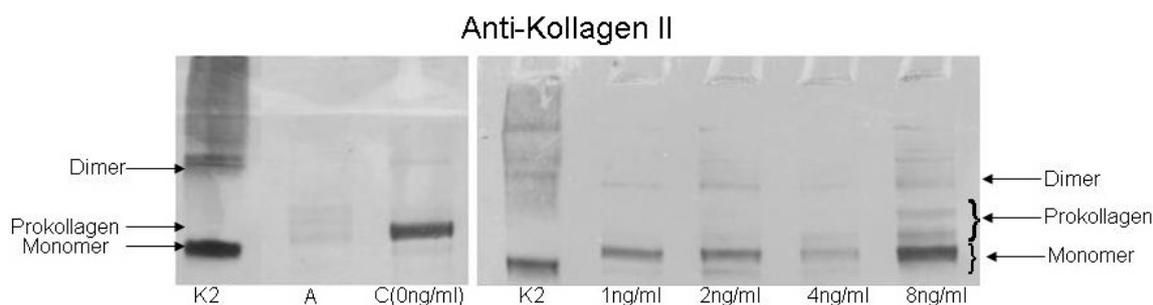
**Abbildung 4.6:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat unter Supplementierung von TGF- $\beta_1$  in verschiedenen Konzentrationen. TGF- $\beta_1$  in  $\frac{ng}{ml}$ ; Anfang= Ausgangswert vor der Alginatphase; Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  TGF- $\beta_1$ .

Die semiquantitative Auswertung der Kollagengehalte durch Immuno-Blot-Analyse weist im Gegensatz dazu darauf hin, dass TGF- $\beta_1$  die Synthese beider Kollagentypen zu steigern vermag, wobei die höchste Zytokin-Konzentration auch die deutlichsten Effekte zeigt. Dabei werden leichte qualitative Unterschiede beobachtet. Wie die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 4.7 zeigt, bewirkt TGF- $\beta_1$  beim Kollagen Typ I die vermehrte Bildung von Prokollagen, Kollagen-Monomer und -Dimer, während bei

Typ II vor allem die Monomer-Bildung von der Zytokin-Behandlung zu profitieren scheint (Abb. 4.8).



**Abbildung 4.7:** Einfluss von TGF- $\beta_1$  auf die Kollagensynthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate unter Supplementierung verschiedener TGF- $\beta_1$  Konzentrationen. K1=Kollagenstandard Typ 1, C=Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  TGF- $\beta_1$ , A=Ausgang vor der Redifferenzierung. TGF- $\beta_1$  in  $\frac{ng}{ml}$ .

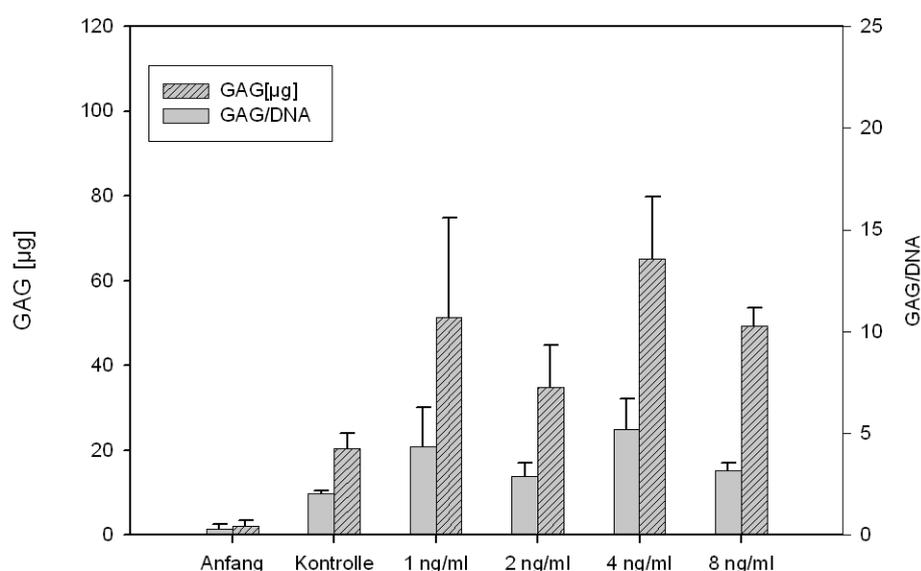


**Abbildung 4.8:** Einfluss von TGF- $\beta_1$  Konzentration auf die Kollagensynthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate unter Supplementierung verschiedener TGF- $\beta_1$  Konzentrationen. K2=Kollagenstandard Typ 2, C=Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  TGF- $\beta_1$ , A=Ausgang vor der Redifferenzierung. TGF- $\beta_1$  in  $\frac{ng}{ml}$ .

Wie zu erwarten, konnte für den Kollagen Typ II keine Anfärbung mit den eingesetzten dedifferenzierten Zellen erzielt werden (A in Abbildung 4.8), wohl aber mit einer Kontrolle ohne Zytokine. Zum Vergleich ist das Ergebnis der Untersuchung dieses Effektes auf die Ausgangszellen von IGF-I aus Abbildung 4.5 hier noch einmal wiedergegeben. Da die Intensität der Immunoanfärbungen verschiedener Experimente schwankt, lassen sich die beiden Blots nicht quantitativ vergleichen.

#### 4.1.4 Der Einfluss von PDGF auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten

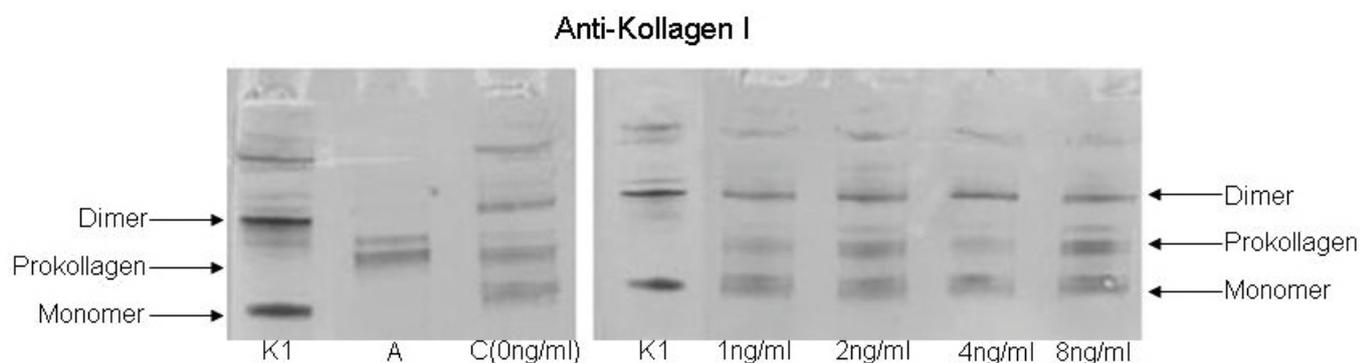
Um die Möglichkeit der Redifferenzierung durch PDGF-BB allein zu überprüfen, wurden über acht Passagen dedifferenzierte humane Chondrozyten in Alginat eingebettet und für 21 Tage bei verschiedenen Konzentrationen des Zytokins PDGF-BB bei 5% O<sub>2</sub> kultiviert. Wie Abbildung 4.9 zeigt, wird die GAG-Synthese während



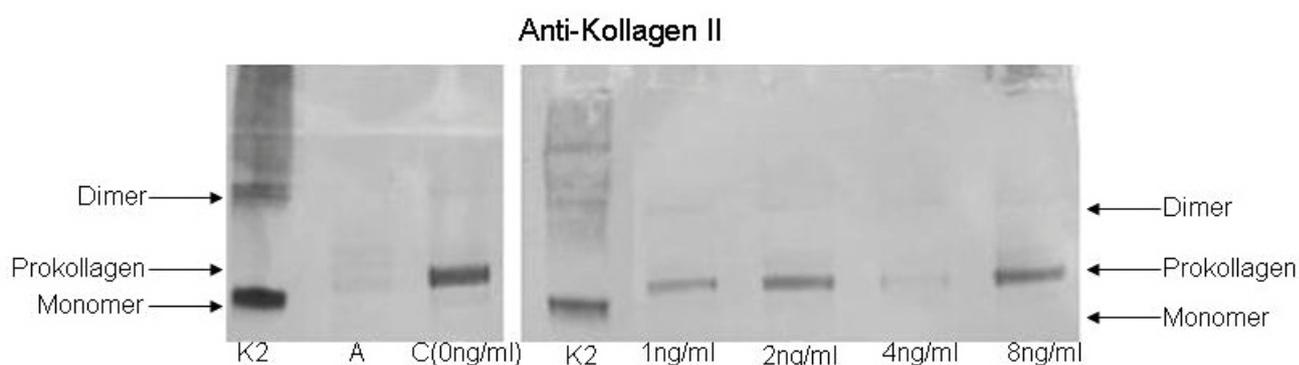
**Abbildung 4.9:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat unter Supplementierung von PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen. PDGF-BB in  $\frac{ng}{ml}$ ; Anfang= Ausgangswert vor der Alginatphase; Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  PDGF-BB. PDGF-BB in  $\frac{ng}{ml}$ .

der 21-tägigen Kultivierung bereits ohne Zusatz eines Zytokins (Kontrolle) leicht gesteigert. Die stufenweise Erhöhung der PDGF-BB-Konzentration von 0 bis auf  $8 \frac{ng}{ml}$  bringt einen weiteren Zusatz, der nicht eindeutig dosisabhängig ist. Die auf den DNA-Gehalt bezogenen Werte (GDQ) liefern kein signifikant anderes Bild, was gegen Störungen durch Zellverlust oder Zellvermehrung spricht.

Die Analyse der Kollagensynthese mit Hilfe des Immuno-Blot-Verfahrens (Abb. 4.10 und 4.11) führte bei den beiden untersuchten Kollagentypen zu geringfügig unterschiedlichen Ergebnissen. Während die Bildung des Kollagen Typ I kaum durch die Gegenwart von PDGF beeinflusst zu werden scheint, wird für den Kollagen Typ II eine leicht mit der Dosis ansteigende Syntheserate beobachtet. Die intensivste Bande wird bei der höchsten Konzentration beobachtet. Die ausbleibende Anfärbung beim



**Abbildung 4.10:** Einfluss von PDGF-BB auf die Kollagen Typ I Synthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate unter Supplementierung verschiedener PDGF-BB Konzentrationen. K1=Kollagenstandard Typ 1, C=Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  PDGF-BB, A=Ausgang vor der Redifferenzierung. PDGF-BB in  $\frac{ng}{ml}$ .



**Abbildung 4.11:** Einfluss von PDGF-BB auf die Kollagen Typ II Synthese von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate unter Supplementierung verschiedener PDGF-BB Konzentrationen. K2=Kollagenstandard Typ 2, C=Kontrolle mit  $0 \frac{ng}{ml}$  PDGF-BB, A=Ausgang vor der Redifferenzierung. PDGF-BB in  $\frac{ng}{ml}$ .

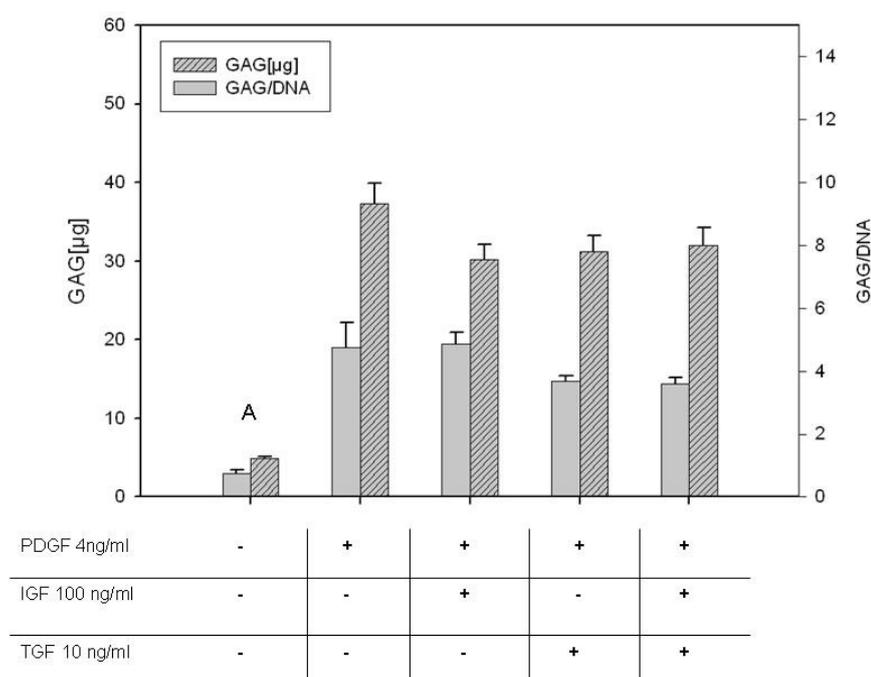
Ansatz mit  $4 \frac{ng}{ml}$  wurde möglicherweise durch einen technischen Fehler verursacht. Ein qualitativer Vergleich zeigt ebenfalls leichte Unterschiede: Während die Synthese des Kollagens Typ II nur das unfertige Produkt Prokollagen liefert, erscheint der Typ I bereits im wesentlichen als fertiges Monomer und Dimer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Redifferenzierung unter dem Einfluss von PDGF-BB auch bei allen drei untersuchten Parametern zu unterschiedlichen Effekten führt.

## 4.2 Einfluss der kombinierten Zytokine

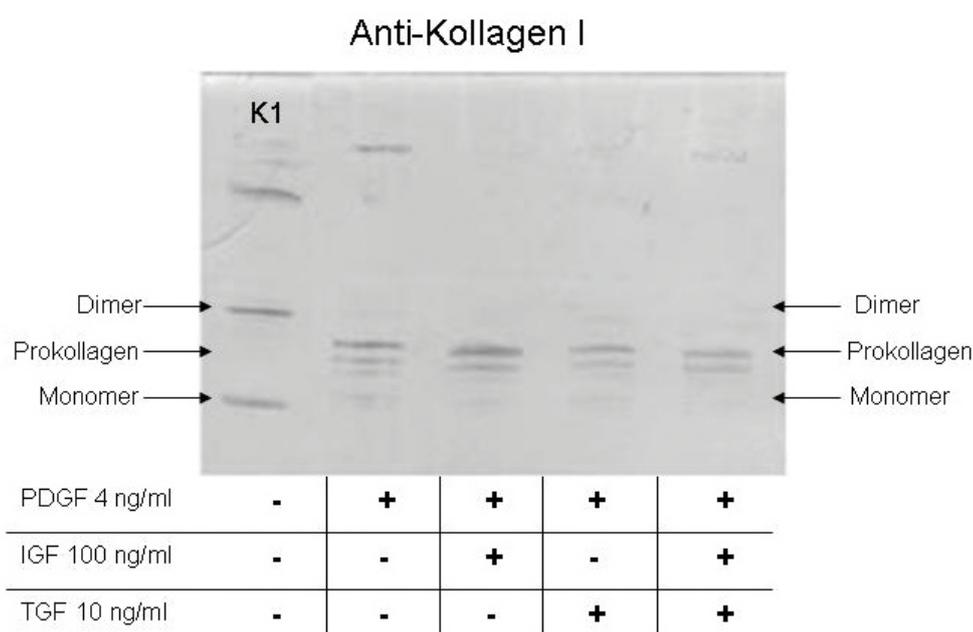
### 4.2.1 Der Einfluss des kombinierten Einsatzes von PDGF, TGF- $\beta_1$ und IGF-I (PIT) auf die Redifferenzierung von humanen Chondrozyten

Einzeln eingesetzt zeigten alle drei Zytokine sehr differenzierte Effekte auf die GAG- und Kollagensynthese während der Redifferenzierung der humanen Chondrozyten. Mit dem kombinierten Einsatz sollte herausgefunden werden, ob sich das Resultat durch synergistische Effekte optimieren lässt. Zu diesem Zweck wurden die Chondrozyten wie beschrieben dedifferenziert und anschließend für 21 Tage in Alginate in Gegenwart verschiedener Zytokin-Kombinationen kultiviert. Dabei wurden für die Zytokine jeweils die Konzentrationen gewählt, für die im Einzelnen bereits gute Ergebnisse erzielt werden konnten: PDGF:  $4 \frac{ng}{ml}$ ; IGF-I:  $100 \frac{ng}{ml}$ ; TGF- $\beta_1$ :  $10 \frac{ng}{ml}$ .



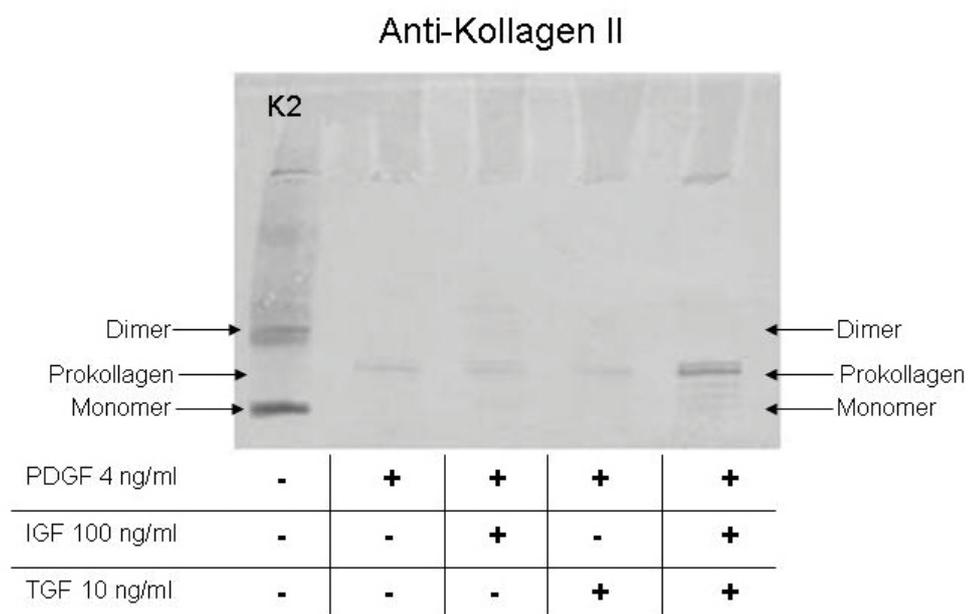
**Abbildung 4.12:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate, supplementierte Faktoren PDGF-BB  $4 \frac{ng}{ml}$ , IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF- $\beta_1$   $10 \frac{ng}{ml}$  in Kombination. A= Ausgangswert vor der Redifferenzierung.

Die Ergebnisse der Analyse der absoluten und DNA-bezogenen GAG-Werte sind in Abbildung 4.12 wiedergegeben. Die auf den DNA-Gehalt bezogene GAG-Syntheseleistung ist beim alleinigen Einsatz von PDGF-BB ebenso hoch, wie in der Kombination mit IGF-I und höher als in allen Kombinationen, die TGF- $\beta_1$  enthalten. Dies scheint den bereits vorher beobachteten, offensichtlich hemmenden Effekt dieses Zytokins zu bestätigen. Bemerkenswert ist aber auch, dass IGF-I allein einen stärker stimulierenden Effekt auf die GAG-Synthese zu haben scheint als in Kombination mit PDGF-BB. Eine Synergie wird in dieser Kombination nicht beobachtet, eher eine Deckelung durch PDGF-BB. Alle Zytokine gemeinsam führen zu einer leichten Hemmung im Vergleich zum optimalen Ergebnis.



**Abbildung 4.13:** Kollagen Blot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat, supplementierte Faktoren PDGF  $4 \frac{ng}{ml}$ , IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$ , TGF- $\beta_1$   $10 \frac{ng}{ml}$ , K1= Kollagen I Standard.

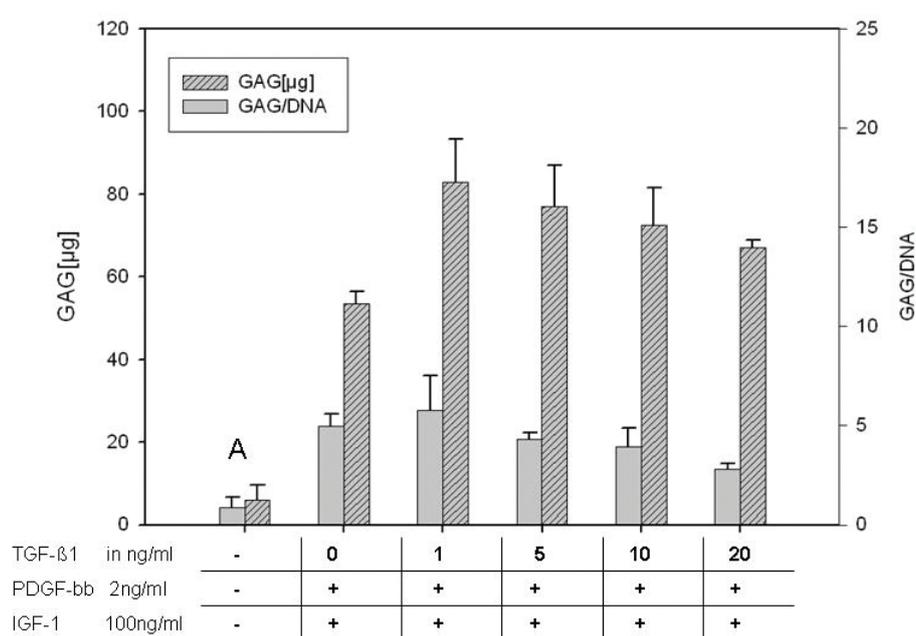
Hinsichtlich der Beeinflussung der Kollagenbildung werden etwas deutlichere Unterschiede festgestellt. Während die Bildung des Kollagens Typ I am meisten von der Kombination aus PDGF-BB und IGF-I zu profitieren scheint, wird die Bildung von Kollagen Typ II deutlich am besten bei Präsenz aller drei Zytokine unterstützt (Abb. 4.14). In beiden Fällen werden präferentiell die unfertigen Prokollagen-Formen gebildet.



**Abbildung 4.14:** Kollagen Blot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate, supplementierte Faktoren PDGF  $4 \frac{ng}{ml}$ , IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$ , TGF- $\beta_1$   $10 \frac{ng}{ml}$ , K2= Kollagen II Standard.

#### 4.2.2 Der Einfluss verschiedener TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen in Gegenwart von IGF-I und PDGF-BB auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten

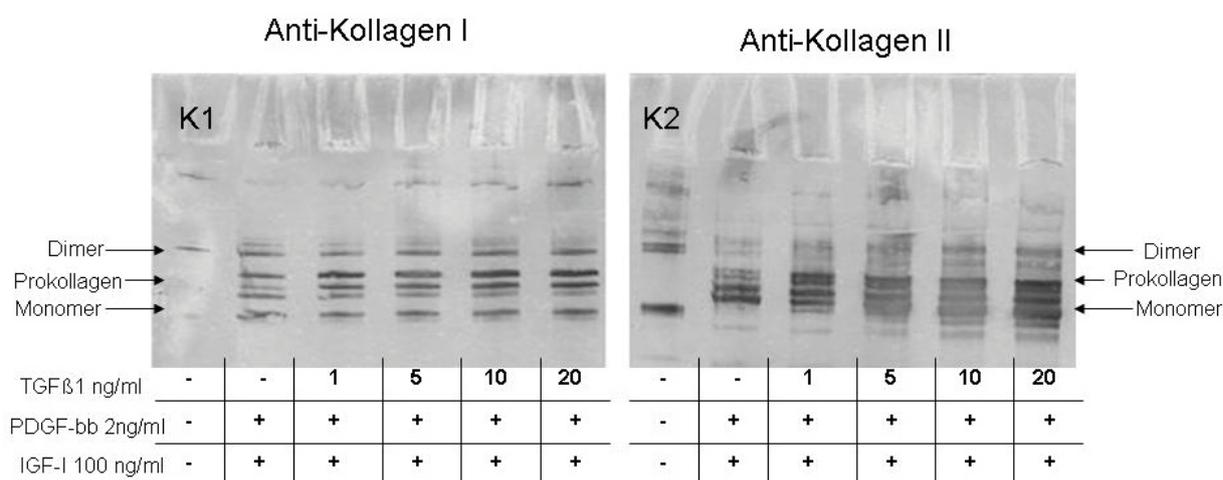
Um festzustellen, ob der divergierende Effekt von TGF- $\beta_1$  auf die Kollagen- und GAG-Bildung in dedifferenzierten humanen Chondrozyten möglicherweise durch Herabsetzung der Konzentration des Zytokins abgeschwächt werden kann, wurde eine Konzentrationsabhängigkeit von TGF- $\beta_1$  neben konstanten Konzentrationen der beiden anderen Zytokine IGF-I und PDGF-BB untersucht, letzteres in einer niedrigeren Konzentration als in Versuch 4.2.1.



**Abbildung 4.15:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat, Variation der supplementierten TGF- $\beta_1$  Menge mit PDGF-BB  $2 \frac{ng}{ml}$  und IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$ ; A= Ausgangswert vor der Redifferenzierung.

Das Ergebnis der GAG-Analyse ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Man erkennt, dass die Kombination mit der niedrigsten TGF- $\beta_1$ -Konzentration zur höchsten GAG-Syntheserate führt. Im Vergleich zur Kontrolle ohne TGF- $\beta_1$  wird eine leichte Steigerung der zellbezogenen Syntheseleistung (GDQ) beobachtet, während diese mit ansteigender TGF- $\beta_1$ -Konzentration über  $1 \frac{ng}{ml}$  hinaus dosisabhängig bis unter die Leistung der nur mit IGF-I und PDGF-BB behandelten Zellen (Kontrolle) abfällt. Etwas anders sieht es aus, wenn man die absoluten Syntheseleistungen betrachtet. Hier liegt die GAG-Bildung auch bei der höchsten TGF- $\beta_1$ -Konzentration noch signifikant

über der Leistung der Kontrolle. Als Erklärung muss angenommen werden, dass TGF- $\beta_1$  in diesem Ansatz neben der GAG-Bildung auch die Proliferation der Zellen zu steigern scheint (mitogener Effekt).

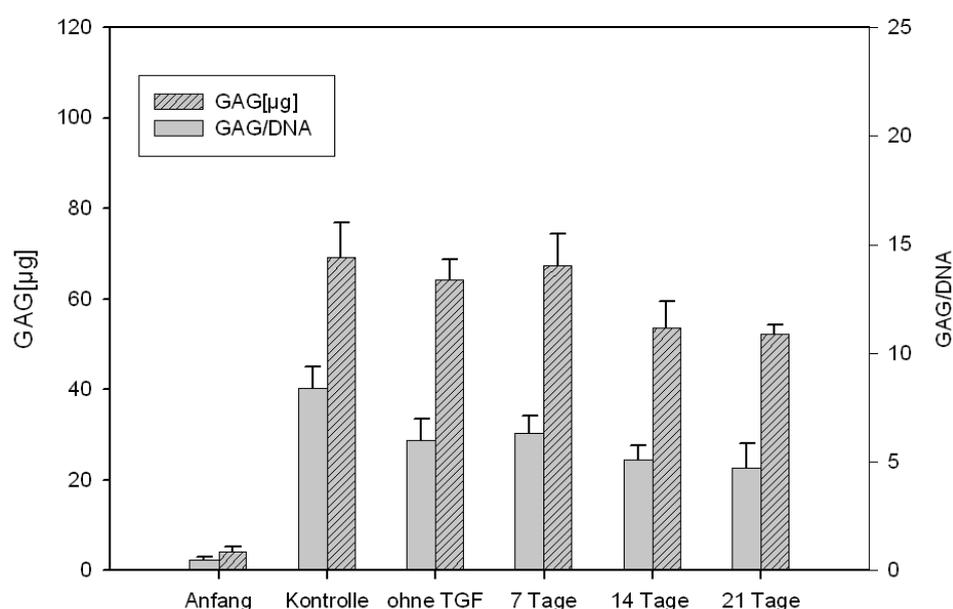


**Abbildung 4.16:** Kollagenblot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat, Variation der supplementierten TGF- $\beta_1$  Menge mit PDGF-BB  $2 \frac{ng}{ml}$  und IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$ . TGF- $\beta_1$  in  $\frac{ng}{ml}$ , K1=Kollagenstandard Typ I, K2=Kollagenstandard Typ II, links Anti-Kollagen Typ I, rechts Anti-Kollagen Typ II.

Hinsichtlich der Kollagensynthese ist sowohl für Typ I als auch für Typ II eine dosisabhängige Steigerung in Gegenwart von TGF- $\beta_1$  neben IGF-I und PDGF-BB deutlich erkennbar (Abb. 4.16). In beiden Fällen scheinen zudem die Prokollagen-Formen zu überwiegen.

### 4.2.3 Zeitliche Limitierung des TGF-Effektes in der Kombination PIT mit niedriger PDGF Konzentration

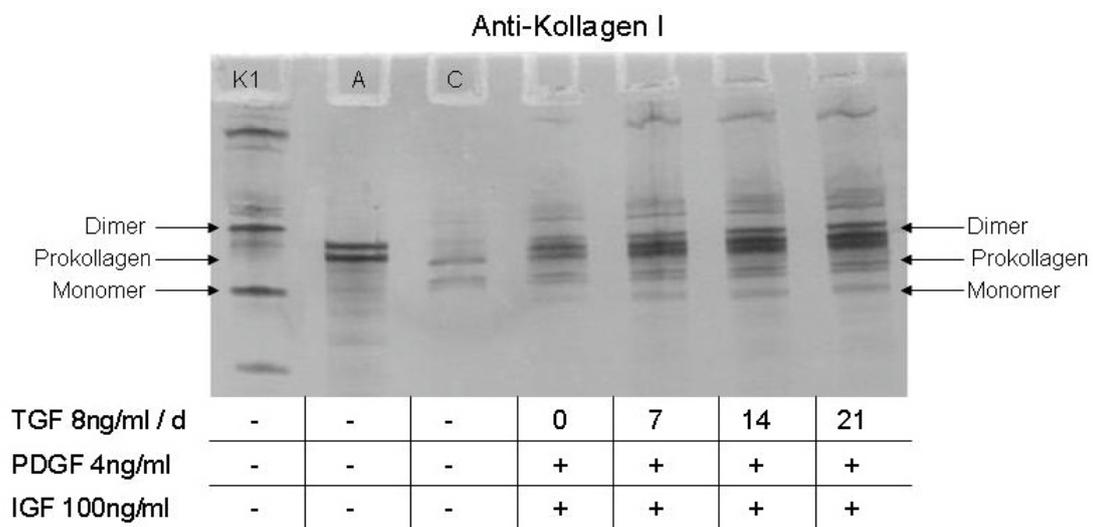
Neben einer Herabsetzung der Konzentration ist der zeitlich limitierte Einsatz von TGF- $\beta_1$  neben IGF-I und PDGF-BB eine weitere Möglichkeit, die „störenden“ Effekte dieses Zytokins in der Kombination zu dämpfen. Daher wurden GAG-Syntheserate und Kollagenbildung nach 21-tägiger Kultivierung humaner Chondrozyten in Gegenwart von IGF-I und PDGF-BB bestimmt, während TGF- $\beta_1$  nur für 7, 14 oder 21 Tage zugesetzt worden war. Tatsächlich werden von den für 7 Tage zusätzlich mit TGF- $\beta_1$



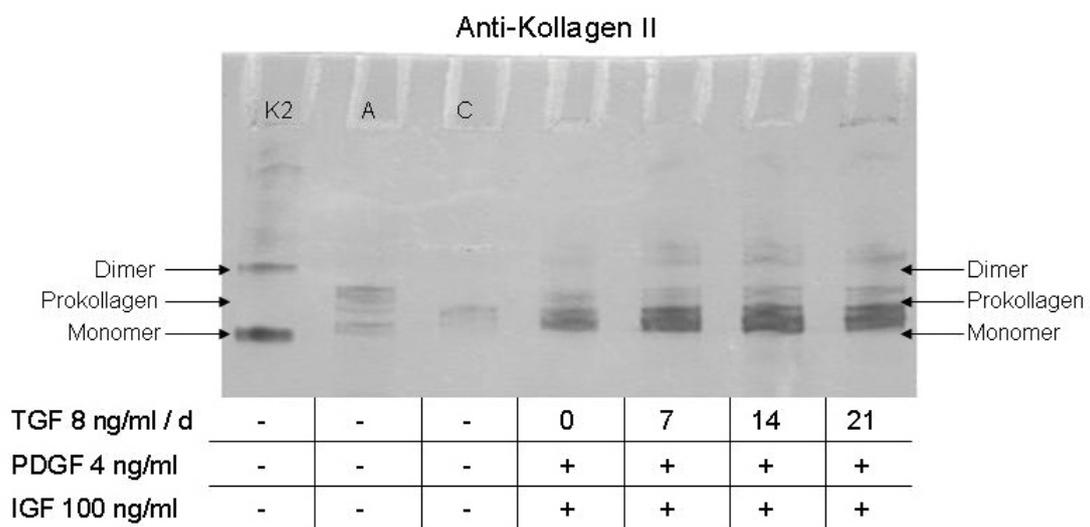
**Abbildung 4.17:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate. Supplementierung von TGF- $\beta_1$   $8 \frac{ng}{ml}$  für 7, 14 und die Gesamtlaufrzeit von 21 Tagen, zusätzlich PDGF  $4 \frac{ng}{ml}$  und IGF  $100 \frac{ng}{ml}$ ; Anfang= Ausgangswert vor der Alginatephase; Kontrolle= keine Faktoren.

behandelten Zellen ebensoviel GAG gebildet, wie in Abwesenheit dieses Zytokins. Erst bei verlängerter Exposition für 14 oder 21 Tage fällt die GAG-Syntheseleistung wieder ab.

Die Behandlung mit TGF- $\beta_1$  nur in den ersten sieben Tagen scheint auch für die Wirkung auf die Kollagensynthese ein akzeptabler Kompromiss zu sein. Bei beiden Kollagentypen (Abb. 4.18 und 4.19) scheint die nach siebentägiger TGF- $\beta_1$ -Behandlung erreichte Syntheserate auch bei längerer Behandlung nicht mehr wesentlich übertroffen zu werden.



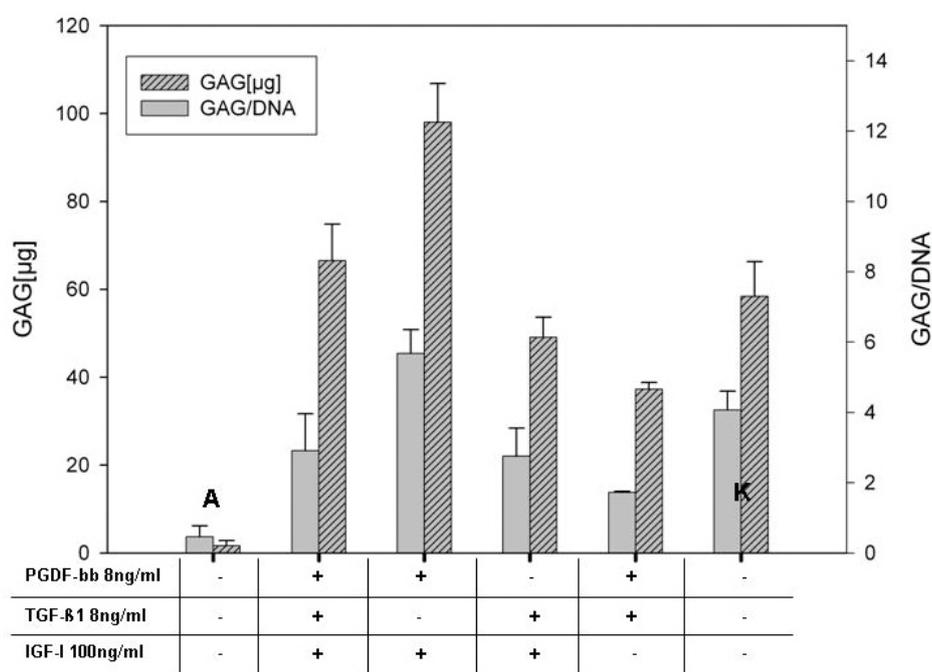
**Abbildung 4.18:** Kollagenblot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. TGF- $\beta_1$   $8 \frac{ng}{ml}$  Zugabe über 7, 14 und 21 Tage, PDGF  $4 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$ , C= Kontrolle ohne Faktoren, A=Anfangswert vor der Redifferenzierung, K1=Kollagen I Standard.



**Abbildung 4.19:** Kollagenblot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. TGF- $\beta_1$   $8 \frac{ng}{ml}$  Zugabe über 7, 14 und 21 Tage, PDGF  $4 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$ , C= Kontrolle ohne Faktoren, A=Anfangswert vor der Redifferenzierung, K2=Kollagen II Standard

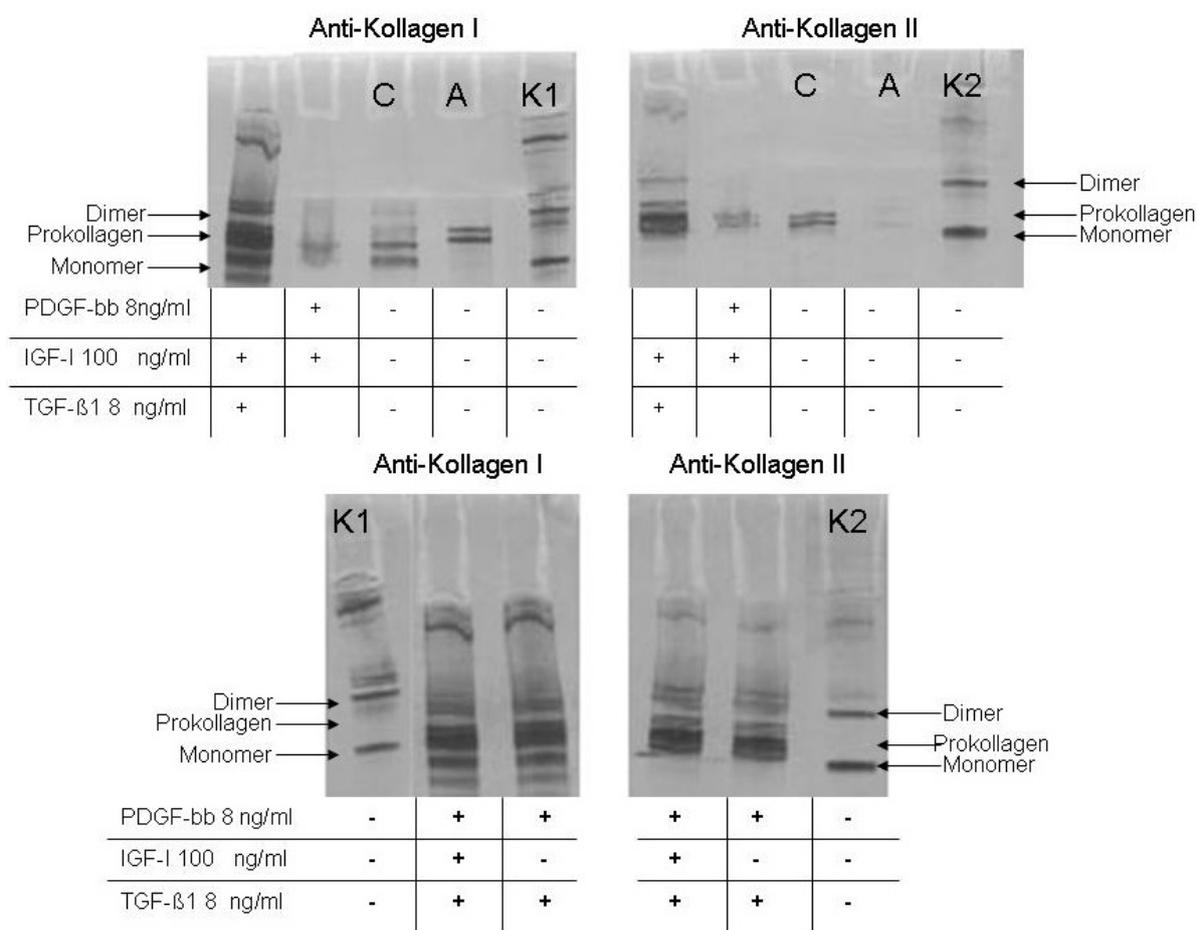
### 4.3 Der Einfluss einer erhöhten PDGF-BB-Konzentration in verschiedenen Zytokinkombinationen auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten

In den bisher beschriebenen Untersuchungen zeigten sich Hinweise sowohl auf Synergien, wie auch auf divergierende Einflüsse der Zytokine auf die beiden wichtigsten Parameter der Redifferenzierung der humanen Chondrozyten, die Synthese von GAG und Kollagen des Typs II. Dabei hat sich ein Kompromiss als optimal erwiesen, bei dem die Wirkung von TGF- $\beta_1$  in der Kombination reduziert wurde. Das hier dargestellte Experiment wurde zusätzlich mit dem Ziel durchgeführt, alternativ die Wirkung einer selektiv erhöhten Konzentration von PDGF-BB zu überprüfen. Die



**Abbildung 4.20:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. Supplementierung von PDGF-BB  $8 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF- $\beta_1$   $8 \frac{ng}{ml}$  zum Medium in angegebener Kombination.

Ergebnisse der Analyse der absoluten und DNA-bezogenen GAG-Werte sind in Abb. 4.20 wiedergegeben. Übereinstimmend wird der stärkste Effekt von der Kombination IGF-I/PDGF-BB ausgeübt. An zweiter Stelle folgt die Kontrolle, bei der keine Zytokine eingesetzt wurden und erst an dritter Stelle die Kombination von allen drei Zytokinen. Die Anwesenheit von TGF- $\beta_1$  führt, wie bereits früher beobachtet, offensichtlich auch hier zu einer Reduzierung der Syntheseleistung.

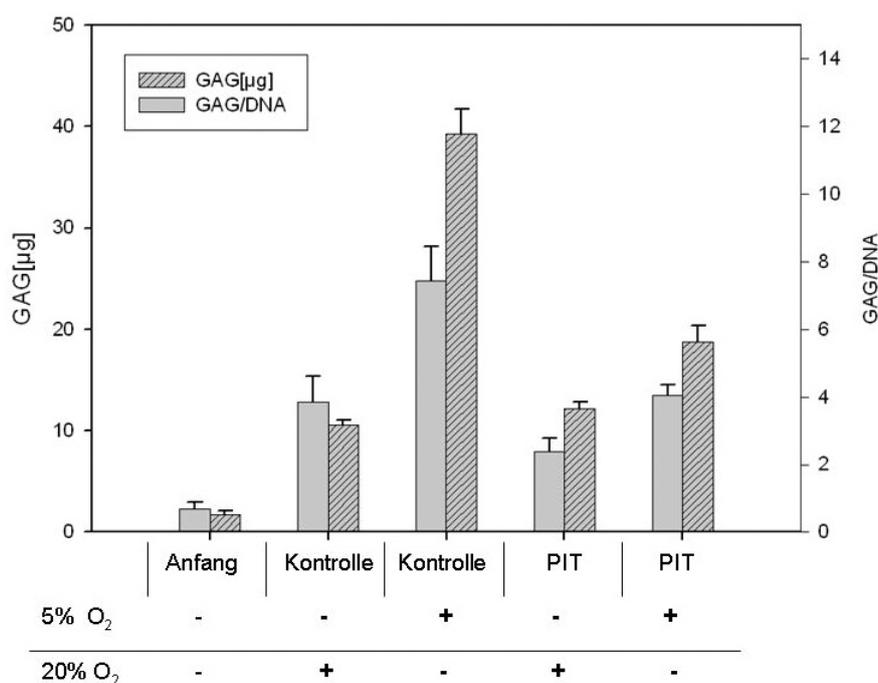


**Abbildung 4.21:** Kollagen Blot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat. Supplementierte Faktoren in Kombination, PDGF-BB  $8 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF- $\beta$ <sub>1</sub>  $8 \frac{ng}{ml}$ . A=Ausgangswerte vor der Redifferenzierung; K1= Kollagen-I Standard; K2=Kollagen-II Standard; C= Kontrolle ohne Faktoren.

Hinsichtlich der Kollagensyntheseleistung sind die Kombinationen unter Einschluss von TGF- $\beta$ <sub>1</sub> derjenigen ohne dieses Zytokin deutlich überlegen. PDGF/IGF bewirkt die beste GAG-Syntheserate bei der niedrigsten Kollagensynthese, PDGF/TGF die höchste Kollagenbildung bei der niedrigsten GAG-Bildung. Daher ergibt sich auch aus dieser Untersuchung die Kombination aus allen drei Zytokinen als bester Kompromiss hinsichtlich der Syntheseleistung von GAG und Kollagen Typ II.

#### 4.4 Der Einfluss eines auf 5% erniedrigten Sauerstoffpartialdrucks auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten in Gegenwart der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$ /PDGF-BB (PIT)

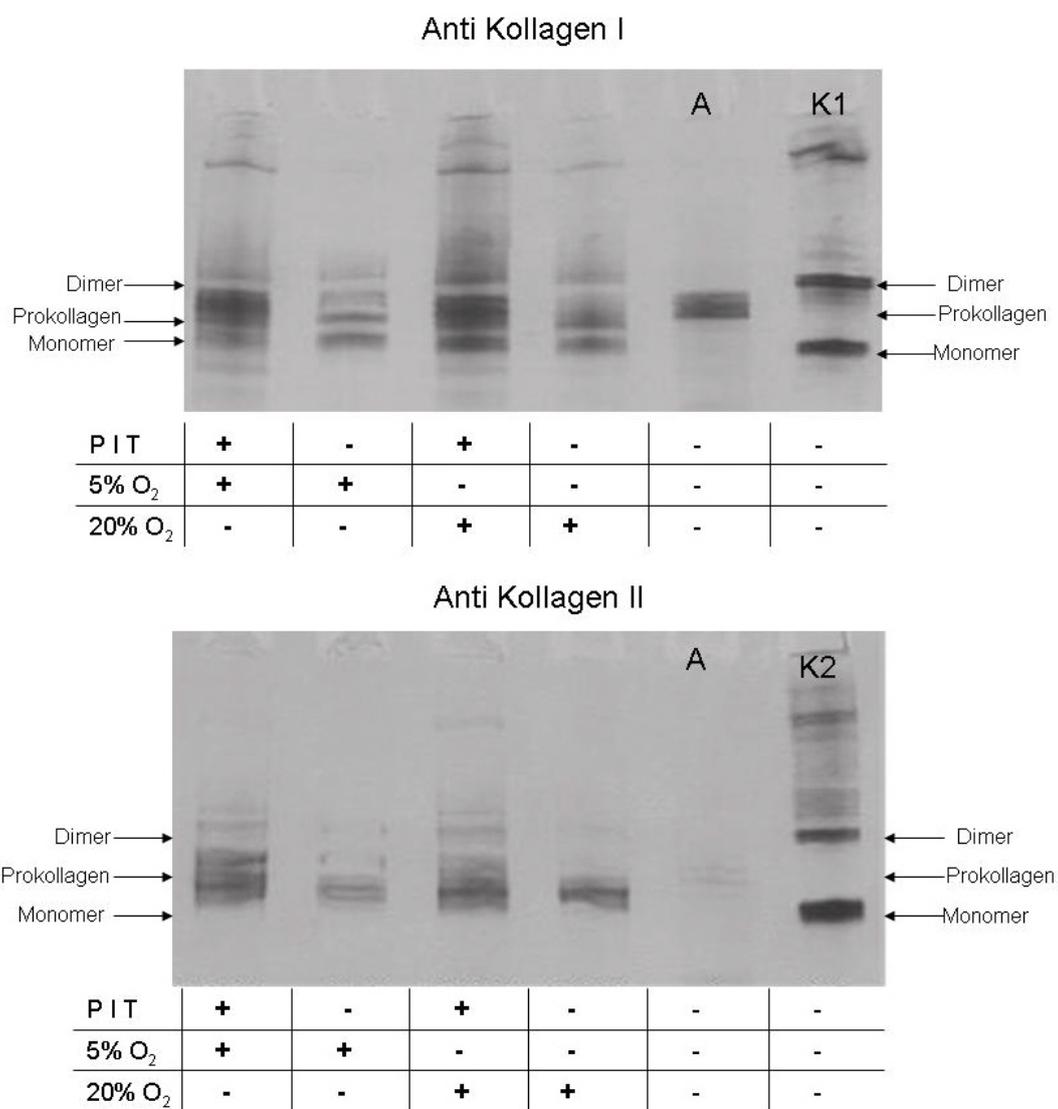
Die positive Wirkung eines auf 5% reduzierten Sauerstoffpartialdrucks auf die Redifferenzierung von Schweinechondrozyten war der Grund, warum die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen diese Bedingung als Standard genutzt haben. Zur Verifizierung dieser Hypothese für die Redifferenzierung von humanen Chondrozyten wurde der Effekt der Kombination aus den drei Zytokinen IGF-I, TGF- $\beta_1$  und PDGF-BB im Vergleich zur Kontrolle ohne Zytokinzusatz, mit und ohne Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks auf 5%, durchgeführt. Als Parameter für die Redifferenzierung wurden wieder die Syntheseraten von GAG und Kollagen Typ I und II bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in den Abbildungen 4.22 und 4.23.



**Abbildung 4.22:** GAG/DNA Analyse von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat bei 5% bzw. 20% Sauerstoff, mit keinen (Kontrolle) bzw. PDGF  $8 \frac{ng}{ml}$ , TGF  $8 \frac{ng}{ml}$  und IGF  $100 \frac{ng}{ml}$  (PIT) als dem Medium hinzugefügten Faktoren.

Man erkennt, dass die absolute und auf die Zellen bezogenen GAG-Syntheseraten bei dedifferenzierten humanen Chondrozyten erheblich von der Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks profitieren. Die Überlegenheit der Kultivierung ohne Zytokine

entspricht den Befunden der vorhergehenden Experimente.



**Abbildung 4.23:** Kollagenblot von (Pseudo)Chondronen nach 21-tägiger Redifferenzierung in Alginat unter Substitution von PDGF-BB  $8 \frac{ng}{ml}$ , IGF-I  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF- $\beta_1$   $8 \frac{ng}{ml}$  (PIT) bei 5% bzw. 20% Sauerstoff, A= Ausgangswerte vor der Alginatphase, K1=Kollagen-I Standard; K2=Kollagen-II Standard.

Etwas anders sieht es aus, wenn man den Effekt der Kulturbedingungen auf die Kollagensyntheseraten betrachtet. Hier scheint die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks von 5% auf 20% keine signifikanten Unterschiede zu bewirken. Daneben wird hier der

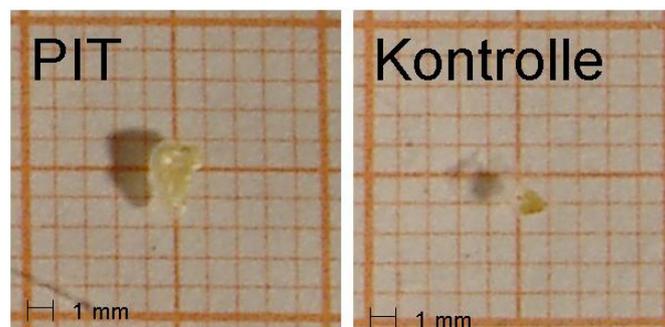
Vorteil der Behandlung mit der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$ /PDGF-BB (PIT) gegenüber der Kontrolle offensichtlich für beide untersuchten Kollagentypen noch einmal reproduziert. In dieser Hinsicht entsprechen die Befunde denen des Schweine-systems. Während die GAG-Synthese von der Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks profitiert, reagiert die Kollagensynthese nicht signifikant auf die Behandlungsunterschiede. Damit wird die Behandlung mit einer Kombination aus allen drei Zytokinen (PIT) noch einmal als bester Kompromiss für die Stimulierung der Matrixsynthese bestätigt.

## 4.5 Der Einfluss der Zytokinkombination auf die Matrixsynthese in der Pelletkultur aus humanen Chondrozyten

Die Bestimmung der Syntheseraten von GAG und den beiden Kollagentypen I und II nach Kultivierung in Alginatgel wurde nur hilfsweise als Parameter für das Ausmaß der erreichten Redifferenzierung herangezogen, um die Einflüsse verschiedener Zytokinkombinationen zu untersuchen. Als relevantes Maß für die erreichte Redifferenzierung während der 21-tägigen Kultivierung der im Alginatgel eingebetteten Chondrozyten kann nur ein Vergleich der Matrixsyntheserate in Pelletkulturen, mit und ohne vorangehende Redifferenzierung in Alginatgel, gelten.

### 4.5.1 Der Einfluss der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$ /PDGF-BB auf die Matrixsynthese in Pelletkulturen aus dedifferenzierten humanen Chondrozyten

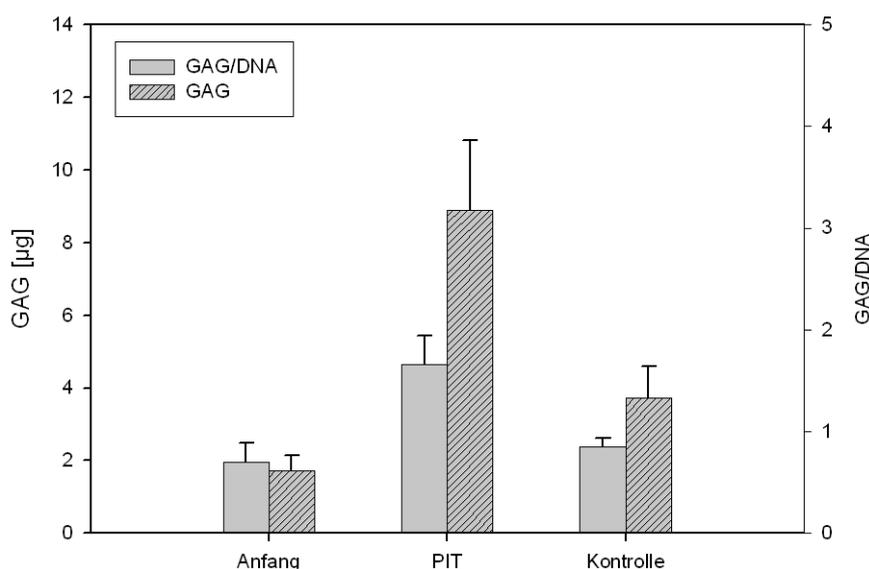
Humane artikuläre Chondrozyten (HAC) wurden nach Standardprotokoll (siehe 3.2.2) mit Hilfe der konventionellen Monolayer-Technik vermehrt und trypsiniert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und jeweils  $10^6$  Zellen zur Pelletkultur zentrifugiert. Nach zwei Tagen Aggregation wurden die Pellets für weitere 21 Tage bei 20% Sauerstoffanteil in der Gasphase in Standardmedium (siehe 3.1.4) kultiviert. Wenn angegeben (PIT) wurde die Knorpelbildung durch Zusatz von Zytokinen ( $8 \frac{ng}{ml}$



**Abbildung 4.24:** Knorpelpellets nach 21 Tagen Pelletkultur in direkter Chondrogenese mit (PIT) und ohne (Kontrolle) Zusatz von Zytokinen.

PDGF,  $100 \frac{ng}{ml}$  IGF-I,  $8 \frac{ng}{ml}$  TGF- $\beta_1$ ) unterstützt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die erzeugten Pellets fotografiert (Abbildung 4.24). Der Einfluss der Zytokinkombination war bereits makroskopisch erkennbar. Die mit PIT behandelten Pellets waren deutlich größer und fester. Die Kontrolle erschien dagegen wasserhaltiger und weicher zu sein. Die Proben trockneten unter der Wärme der Fotolampe rasch ein.

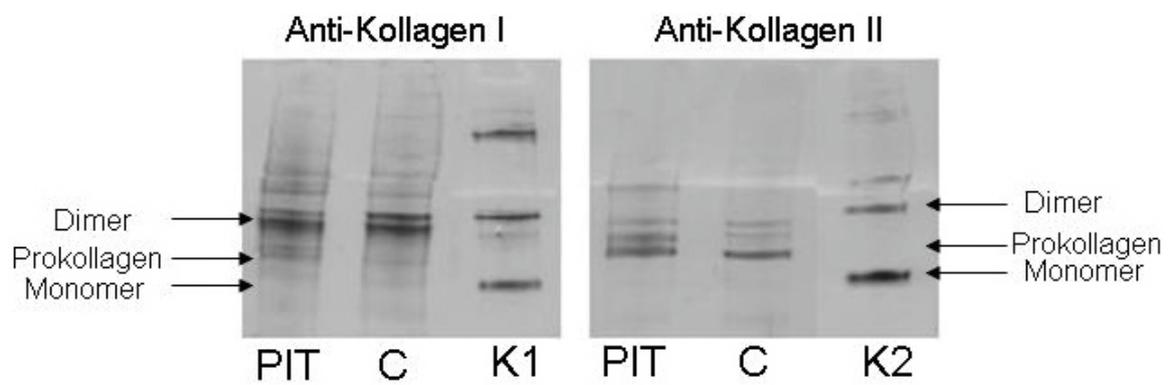
Die biochemische Analyse ergab für die PIT-Pellets einen signifikant höheren Gehalt an Glykosaminoglykanen und damit auch einen höheren GAG/DNA-Quotienten (GDQ) im Vergleich zur Kontrolle und zum Anfangswert. Der deutlich geringere Anstieg des GDQ im Vergleich zum Betrag der absoluten GAG-Synthese ist wahrscheinlich Folge einer Zunahme der Zellzahl während der Chondrogenese.



**Abbildung 4.25:** Darstellung der GAG/DNA-Quotienten der in 21-tägiger direkter Chondrogenese gebildeten Knorpelpellets: PIT=mit Kontrolle= ohne Zusatz von Zytokinen; Anfang = Analyse zu Beginn der 21-tägigen Chondrogenese.

Eine mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und II durchgeführte Immunoblot-Analyse (Abb. 4.26) offenbarte die Präsenz beider Kollagentypen in den Knorpelproben. Dabei fielen die Unterschiede zwischen den Zytokin-behandelten und unbehandelten Ansätzen eher marginal aus. Aus den Positionen der Kollagenbanden lässt sich ableiten, dass die beiden Kollagentypen unabhängig von der Behandlung mit Zytokinen in unterschiedlicher molekularer Form auftraten. Während die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit beim Kollagen Typ I eher der des Dimers entsprach, konnten für Kollagen Typ II praktisch ausschließlich verschiedene Prokollagene nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass die Bildung von Kollagen Typ I zum Zeitpunkt der Analyse bereits abgeschlossen war, während die des Typs II gerade begonnen hatte.

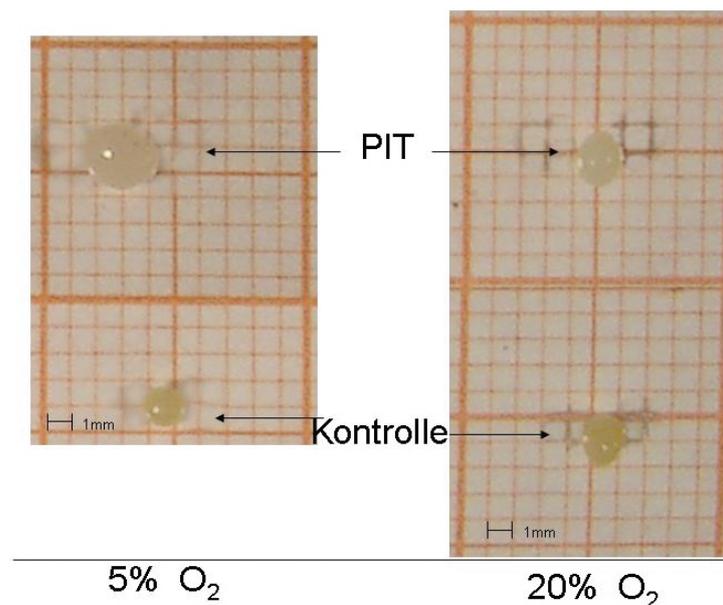
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von PIT während der direkten Chondrogenese *in vitro* zwar die Bildung der Glykosaminoglykane, nicht aber die der Kollagentypen I und II zu unterstützen scheint.



**Abbildung 4.26:** Kollagen Blot der in der Pelletkultur erzeugten Knorpel pellets. Mit Wachstumsfaktoren PIT und ohne (C=Kontrolle). Links Anti-Kollagen I, rechts Anti-Kollagen II. K1, K2=Kollagen I und II Standards.

#### 4.5.2 Einfluss der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$ /PDGF-BB auf die Matrixsynthese in Pelletkulturen aus redifferenzierten humanen Chondrozyten

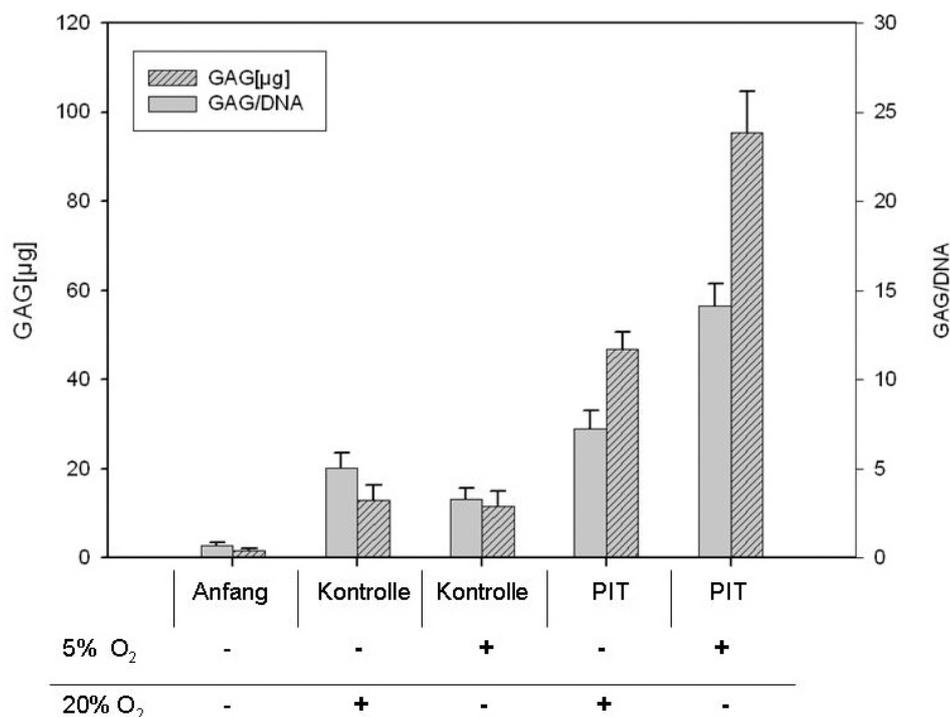
Um den Effekt der Behandlung der humanen Chondrozyten in Alginategel in Anwesenheit der Zytokinkombination IGF-I/TGF- $\beta_1$ /PDGF-BB (PIT) auf die Redifferenzierung zu überprüfen, soll ein Vergleich der Matrixsyntheseraten der behandelten Zellen in Pelletkulturen durchgeführt werden. *In vitro* über acht Passagen vermehrte humane Chondrozyten wurden, wie unter Versuch 4.4 beschrieben, zur Redifferenzierung in Alginategel eingebettet und für 21 Tage in An- bzw. Abwesenheit der Zytokinkombination PIT kultiviert und bei 5% bzw. 20% Sauerstoff redifferenziert. Die anschließend mit Hilfe eines  $\text{Ca}^{++}$ -Chelators daraus befreiten Zellen (Pseudochondrone) wurden dann, wie unter 4.5.1 für dedifferenzierte Chondrozyten beschrieben, für 21 Tage zur Matrixsynthese in Pellet-Kulturen verwendet. Die im Laufe von 21 Tagen gebildeten Pellets wurden fotografisch dokumentiert (Abb. 4.27) und vermessen, der GAG und DNA Gehalt wie beschrieben analysiert. Wie in Abbildung 4.27 zu erkennen ist,



**Abbildung 4.27:** Knorpelpellets nach 21 Tagen Chondrogenese und vorausgegangener 21-tägiger Redifferenzierung in Alginate bei 5% bzw. 20% Sauerstoff, ohne (Kontrolle) und mit den Zytokinen PDGF  $8 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ , IGF  $100 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  und TGF  $8 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  (PIT); exemplarisch sind je zwei Pellets dargestellt bei  $n=5$  pro Gruppe.

scheint sowohl die Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks auf 5%, wie auch die Behandlung mit der Zytokinkombination PIT in der Redifferenzierungsphase einen

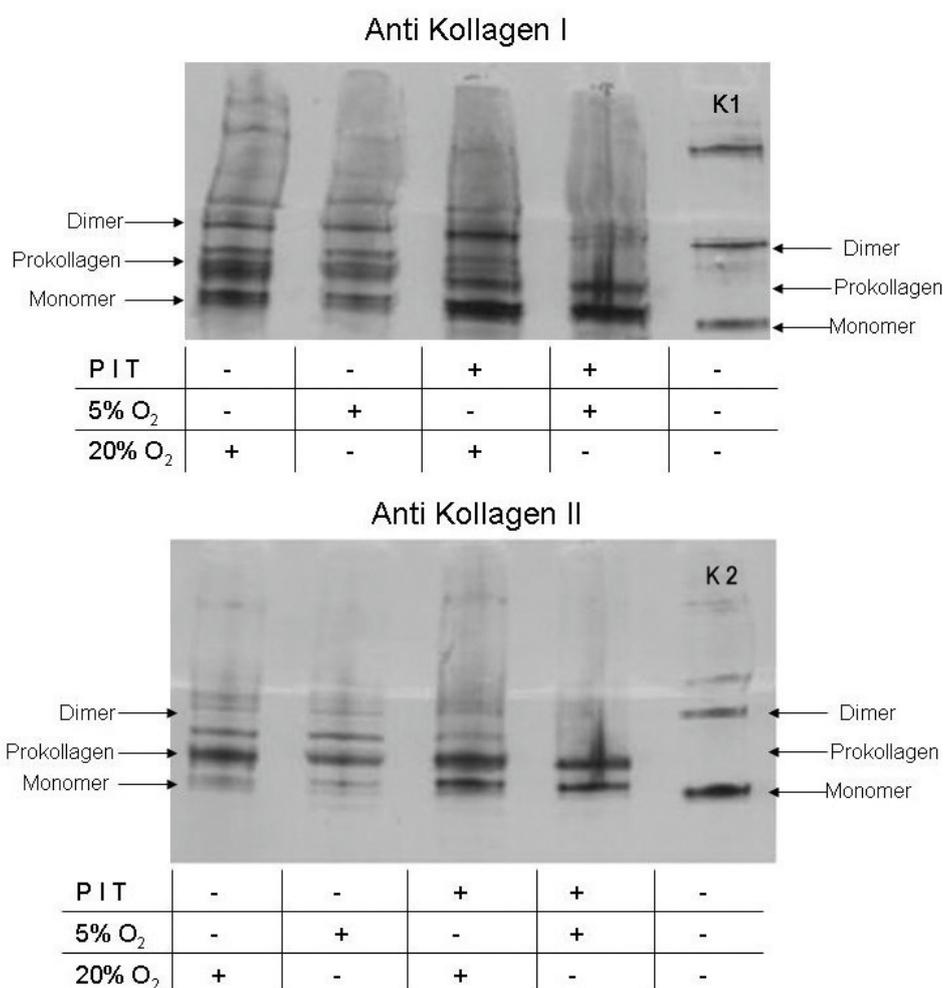
stimulierenden Effekt auf die Matrixsynthese in der Pelletkultur zu haben. Die Kontrollen ohne Zytokinbehandlung bzw. bei 20% Sauerstoffpartialdruck sind deutlich kleiner. Ein ganz analoges Ergebnis wurde nach Auswertung der Bestimmung der absoluten und auf die Zellzahl bezogenen GAG-Gehalte der Pellets erzielt. Das Ergeb-



**Abbildung 4.28:** GAG/DNA Analyse der nach Aggregation von in Alginat redifferenzierten Chondronen erzeugten Pellets. Angabe des während der vorausgegangenen Redifferenzierungsphase in Alginat eingestellten Sauerstoffgehalts in % und den verwendeten Zytokinen mit keinen (Kontrolle) bzw. PDGF  $8 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF  $8 \frac{ng}{ml}$  (PIT).

nis ist in der Abbildung 4.28 dargestellt. Die höchste Syntheserate wurde beobachtet, wenn die Zellen bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck mit der Zytokinkombination PIT behandelt wurden. Die semiquantitative Immunoblot-Analyse der Kollagentypen I und II (Abb. 4.29) lieferte ebenfalls die besten Ergebnisse, wenn die Zellen mit der Zytokinkombination PIT behandelt worden waren. Dagegen hatte die Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks auf 5% keinen sichtbaren Effekt. Allerdings scheint die relativ intensive Anfärbung der Immunoblots darauf hinzuweisen, dass sich alles auf deutlich höherem Niveau abspielt, als bei den bisher präsentierten Ergebnissen.

Diese These wird einerseits unterstützt durch einen Vergleich mit dem Ergebnis, das für die Chondrogenese mit dedifferenzierten Chondrozyten erzielt wurde und in Versuch 4.5.1 dargestellt wurde. Zunächst offenbart die fotografische Dokumen-



**Abbildung 4.29:** Kollagen Blot der nach der Redifferenzierung in Alginat durch Chondroneogenese in Pelletkultur erzeugten Pellets; K1=Kollagen I Standard; K2=Kollagen II Standard; PIT= PDGF  $8 \frac{ng}{ml}$ , IGF  $100 \frac{ng}{ml}$  und TGF  $8 \frac{ng}{ml}$ .

tation der Pelletgrößen die Überlegenheit der Redifferenzierung in Alginat. Unter den konkreten Bedingungen produzierten die in Alginat differenzierten humanen Chondrozyten mehr als doppelt so große Knorpelproben in der Pelletkultur, wie die undifferenzierten Zellen. Ähnlich sieht es für die GAG-Syntheseraten aus. Die von den in Alginat differenzierten Zellen erreichten, auf die Zellzahl bezogenen Syntheseraten (GDQ) überstiegen die von undifferenzierten Zellen gezeigten Syntheseleistungen um den Faktor sieben (Abb. 4.28 vs. 4.25). Da die semiquantitativen Immunoblot-Analysen keine quantitativen Schlüsse zulassen, sei auf die qualitativen

Unterschiede hingewiesen. Während die in der Pelletkultur ohne vorhergehende Redifferenzierung gebildeten Kollagenspezies sämtlich Prokollagene darstellen, kann nach der Differenzierung in Alginat ein deutlicher Anteil der Kollagene als Monomer identifiziert werden. Ein weiterer Hinweis auf die Überlegenheit der vorhergehenden Redifferenzierung in der Alginatkultur kann aus dem Vergleich der makroskopischen Größe der gebildeten Knorpelproben abgeleitet werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zell- und gewebebasierte Therapieansätze

Die etablierten Therapieverfahren mit Anbohrung des subchondralen Knochens (z.B. Pridie-Bohrung, Mikrofrakturierung) beruhen auf der Induktion einer Defektheilung mit Bildung von Faserknorpel (*Scarring*-Reaktion) durch Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen aus der subchondralen Lamelle. Bei der Behandlung von Knorpelschäden ist die ACT (*Autologe Chondrozyten Transplantation*), auch bekannt als ACI (*Autologe Chondrozyten Implantation*), mit Zulassung durch den „Gemeinsamen Bundesausschuss“ (G-BA) zu einer Therapieoption bei Knorpelschäden geworden und verdrängt die etablierten Verfahren zunehmend. Diese Anerkennung durch die gesetzlichen Krankenversicherungen ist jedoch an die Erfüllung bestimmter Qualitätskriterien gebunden (modifiziert 2009). So gilt zum Beispiel für die Indikationsstellung bei Schäden am Kniegelenk, dass Achsabweichungen um mehr als 5°, Bandinstabilitäten mehr als Grad I (nach Lachmann) und Arthrosezeichen ab Grad II (nach Kellgren und Lawrence) bei nicht mehr als 10% der behandelten Patienten dokumentiert sein dürfen (www.g-ba.de 2009). Durch die genannten Indikationskriterien für die ACI werden nach wie vor bestimmte Patientengruppen ausgeschlossen, namentlich solche mit degenerativer Arthrose, also meist ältere Patienten. Dennoch spricht noch ein Zeitvorteil für die ACI. Denn bei der ACI kann die Bildung des Ersatzgewebes unmittelbar nach Implantation der Zellen beginnen, während sie bei den bisherigen Behandlungsmethoden vom langsamen Einsprießen der mesenchymalen Stammzellen in die Defektstelle abhängig ist. Hinsichtlich des Therapieerfolgs scheint es allerdings bisher keine großen Unterschiede zu geben. In einer Studie von Knutsen et al. zeigten beide Verfahren nach fünf Jahren ähnliche klinische Ergebnisse (Knutsen et al. 2007).

Neben den zellinduzierten Methoden konnte sich die OATS als unmittelbar chirurgische Therapie etablieren. Dieses Verfahren verdankt ihren Erfolg hauptsächlich dem Einsatz bei kleinflächigen, umschriebenen unifokalen Knorpelläsionen, vor allem im Bereich des Sprunggelenks (z.B. bei osteochondralen Läsionen des Talus) und des Kniegelenks. Eine Anwendung bei großflächigen Defekten ist dabei nur eingeschränkt möglich. Für das hierbei verwendete Verfahren der Mega-OATS geltende Ausschlusskriterien sind eine generalisierte Arthrose, ligamentäre Instabilitäten (des Kniegelenks) und Patienten über 55 Jahre (Brucker et al. 2008). Im Vergleich zu den zellinduzierten Verfahren gibt es noch einen weiteren Nachteil: Durch die notwendige Entnahme eines Knorpel-Knochen-Autografts in unmittelbarer Nachbarschaft zur

belasteten Gelenkfläche wird eine neue Läsion gesetzt. Sie lässt sich zwar durch Induzierung der Bildung von Faserknorpel wieder auffüllen, führt aber langfristig zu einer verminderten mechanischen Stabilität des gesamten Gelenks. Mit der *ex vivo*-Herstellung von Knorpel-Knochen-Implantaten verfolgt man im Rahmen des *Tissue Engineering* im Grunde das erfolgreiche Konzept der OATS, jedoch unter Vermeidung des Entnahmeschadens am Rand der Gelenkfläche. Darüber hinaus bietet dieser Therapieansatz einen wichtigen Vorteil im Vergleich zu den zellinduzierten Verfahren: Eine Qualitätskontrolle bzw. -sicherung des *ex vivo* herzustellenden Knorpelgewebes erfolgt vor der Implantation. Dies eröffnet erstmals die einzigartige Möglichkeit, Knorpelschäden nachhaltig zu heilen, was insbesondere jüngeren Patienten mit weniger ausgedehnten Defekten zugute kommen sollte. Während bei der ACI/ACT nach der Transplantation der Zellen kaum noch eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Qualität des sich neu bildenden Knorpelgewebes besteht, kann beim *Tissue Engineering*-Ansatz dafür gesorgt werden, dass nur biomechanisch kompetenter hyaliner Gelenkknorpel implantiert wird. Der Vorteil der ACI beschränkt sich dann auf die Möglichkeit der Behandlung großflächiger Defekte.

## 5.2 Das 3-Phasen-Modell

Der auf den Methoden des *Tissue Engineering* basierende Therapieansatz ist einerseits hinsichtlich des Heilungserfolgs deutlich anspruchsvoller als die bisherigen Verfahren, andererseits aber auch hinsichtlich des Aufwands. Das erklärt, warum es bisher noch kein Verfahren in der klinischen Anwendung gibt, welches die Transplantation von *ex vivo* hergestelltem hyalinem Knorpelgewebe zur Behandlung humaner Gelenkflächenschäden erlaubt.

Als Gründe sind verschiedene Probleme bekannt, an deren Lösung zurzeit gearbeitet wird. Sie betreffen die Bereitstellung einer ausreichenden Zahl differenzierter autologer Chondrozyten des Patienten, die Herstellung des hyalinen Knorpelgewebes, sowie die nachhaltige Haftung des sich neubildenden Gewebes auf einem biokompatiblen und biodegradierbaren Träger, um nur einige Beispiele zu nennen. Am Tiermodell hingegen wurden schon verschiedene Lösungsansätze erarbeitet und teilweise erfolgreich im Tierversuch erprobt. So auch in der Arbeitsgruppe Adamietz am UKE, in der die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation entstanden. Hier gelang die Herstellung von Knorpelgewebe aus *in vitro* vermehrten Chondrozyten auf einem implantierbaren Biozementträger im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsprojektes nach dem bereits vorgestellten 3-Phasen-Modell. Die Knorpel-Trägermaterial-Zylinder wurden in die Kniegelenke von Schweinen (re)implantiert. Die Ergebnisse des Tierversuchs unterstützten die Tragfähigkeit des neuen Konzepts. Wenn auch neue Probleme sichtbar wurden, konnten doch die wichtigsten Erwartungen erfüllt werden. Die histologischen Untersuchungen lassen erkennen, dass sich im Laufe eines Jahres an den ursprünglichen Defektstellen im Kniegelenk des

Schweins hyalines Knorpelgewebe gebildet hatte und mit den Rändern verwachsen war (Petersen et al. 2008).

Die Etablierung des 3-Phasen-Modells stützt sich auf die Beobachtung, dass sich Chondrozyten im differenzierten Phänotyp allein durch Induzierung intensiver Zell-Zellkontakte zur Bildung eines hyalinen Knorpelgewebes stimulieren lassen. Dieser Prozess wird allerdings gestört, wenn eine heterogene Zellpopulation mit signifikantem Anteil dedifferenzierter Zellen eingesetzt wird. Im 3-Phasenmodell soll den Zellen vor der eigentlichen Chondrogenese in der dritten Phase in einem definierten Zeitraum Gelegenheit zur möglichst vollständigen Bildung differenzierter Chondrozyten gegeben werden. Dieser zweiten Phase der Redifferenzierung geht eine ebenfalls zeitlich begrenzte erste Phase voraus, in der die isolierten Chondrozyten unter optimierten Bedingungen zur Zellteilung stimuliert werden. Die zeitliche Separierung der drei Phasen bietet die Möglichkeit, die jeweiligen Zellfunktionen zunächst durch Einstellung der äußeren Zellkulturbedingungen wie Monolayerkultur in der ersten Phase, Alginatkultur in der zweiten und Pelletkultur in der dritten Phase, zu unterstützen. Darüber hinaus wird vermieden, dass phasenspezifisch zugesetzte Zytokine die Zellfunktionen in anderen Phasen stören.

### 5.2.1 Die Randbedingungen für die Aufgabenstellung

Bisher scheiterten in der Arbeitsgruppe alle Versuche, ausreichende Mengen differenzierter humaner Chondrozyten durch 1:1-Umsetzung der im Tiermodell gesammelten Erfahrungen zu gewinnen. Zwar erwiesen sich die Proliferationsbedingungen zur Vermehrung der Zellen in der konventionellen Monolayerkultur mit Unterstützung durch bFGF bei den humanen Chondrozyten als ähnlich effektiv wie bei den Zellen des Schweins, doch konnte der damit einhergehende Verlust der Eigenschaften des differenzierten Phänotyps in der so genannten Re-Differenzierungsphase mit dem bisherigen Protokoll nicht mehr in ausreichendem Maße rückgängig gemacht werden.

Dieses Problem betrifft auch die zellbasierten Therapiekonzepte wie die ACI. Hier wird das Problem jedoch teils umgangen und teils ignoriert. Frisch isolierte Chondrozyten, sogenannte primäre Zellen, haben auf Grund ihres Differenzierungsstatus noch die Fähigkeit zur Bildung hyalinen Knorpelgewebes. Diese Eigenschaft verlieren sie nicht plötzlich, sondern erst nach und nach während der ersten drei bis vier Passagen, die sie zur Vermehrung durchlaufen müssen. Lässt man sich auf einen Kompromiss ein, indem man die Zellen nur für ein oder zwei Passagen proliferiert, ist nur ein partieller Verlust des Differenzierungsstatus nachweisbar. Diese Beobachtung ist jedoch statistisch zu verstehen, denn der Verlust betrifft nicht alle Zellen einer Population in gleichem Maße. Das heißt, in diesen Zellpopulationen weist ein Teil der Zellen noch den differenzierten Phänotypus auf, der andere Teil jedoch nicht. Werden solche heterogenen Zellpopulationen zur Chondrogenese *in vivo* wie bei der ACI oder *in vitro* im Rahmen des *Tissue Engineering* eingesetzt, ist eine Prognose über

die Qualität des gebildeten Knorpelgewebes nicht mehr möglich. Möglicherweise trägt dies zu den teilweise wenig zufriedenstellenden Ergebnissen der ACI bei.

Als Modell zur Erkundung neuer Bedingungen für die Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten wurde eine solche heterogene Zellpopulation, wie sie durch partielle Dedifferenzierung entsteht, als ungeeignet angesehen. Denn eine leichte quantitative Verschiebung zu Gunsten der differenzierten Zellen einer heterogenen Population ist darin ungleich schwieriger zu erkennen, als wenn man von einer vollständig dedifferenzierten Zellpopulation ausgeht. Um eindeutige Ausgangsbedingungen für die experimentellen Untersuchungen zu schaffen, wurden daher nur Zellen untersucht, wie sie nach acht Passagen erhalten werden.

Wünschenswert wäre sicherlich auch, dass Zellen verschiedener Donoren mit in die Untersuchungen einbezogen würden. Allerdings hätten die damit zu erwartenden Schwankungen auch eine größere statistische Basis erforderlich gemacht, was wegen der zeitlichen Begrenzung der Arbeit verworfen wurde. Alle Experimente wurden daher mit den Zellen nur eines Donors durchgeführt. Dies minimiert den Einfluss unabhängiger Variablen wie Alter und Geschlecht auf die Ergebnisse. Die Wahl eines jungen Donors berücksichtigt dabei den Altersbereich der Zielgruppe eines zukünftigen Verfahrens des *Tissue Engineering*. Die Einschränkung der avisierten Therapiemöglichkeit auf junge Menschen wurde bewusst gemacht. Inzwischen gibt es eine Reihe von Hinweisen dafür, dass das Redifferenzierungspotenzial möglicherweise mit dem Alter deutlich abnimmt. Eine wahrscheinlich altersbedingte Differenz in der Redifferenzierungsleistung von Zellen verschiedener Donoren legte diese Vermutung nahe (Feyerabend 2003). Andere Beobachtungen wiesen auf verminderte Proliferationsraten bei Zellen von Donoren ab der vierten Lebensdekade hin, ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , FGF, PDGF-BB) in der Kultur bereits ab der dritten Lebensdekade (Barbero et al. 2004). Seit längerem ist auch bekannt, dass sich die Bestandteile der Knorpelmatrix mit dem Alter verändern. So nimmt die Größe der Molekülekomplexe der Hyaluronsäure beispielsweise mit dem Alter ab (Kamada et al. 2002). Dazu kommen Hinweise auf ein vermindertes Ansprechen auf Wachstumsfaktoren bei älteren Zellen, zum Beispiel auch PDGF (Mishima und Lotz 2008).

### 5.2.2 Die Alginatkultur als Basis für die Redifferenzierungsphase

Die experimentellen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Erkundung möglicher Effekte von PDGF auf die Redifferenzierungsphase. Das bedeutet, die erprobten Protokolle für die erste Phase, die Proliferation, und die dritte Phase, die Chondrogenese in der Pelletkultur, wurden unverändert übernommen. Für die zweite Phase wurde die gesamte Technik der Alginattechnik ebenfalls ohne Veränderung übernommen. Die Eignung der Alginattechnik zur Redifferenzierung von *in vitro* proliferierten Chondrozyten hat sich bereits im Tiermodell bewährt. Zu den wich-

tigste Vorteilen der Alginattechnik zählt neben der relativ einfachen Handhabung vor allem die Möglichkeit des reversiblen Einschlusses der Chondrozyten, denn zur Erzeugung von transplantationsfähigem Knorpelgewebe müssen die Zellen wieder aus dem Alginat eluiert werden können, um sie anschließend in der Pelletkultur zur Knorpelbildung zu stimulieren. Eingangs wurde bereits erwähnt, dass allein der Einschluss der Zellen in das Alginatgel schon den Prozess der Redifferenzierung zu stimulieren scheint. Möglicherweise ist dafür die niedrige Zelldichte, das heißt, der relativ große Abstand der Zellen voneinander verantwortlich. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sich die im Vergleich zur Pelletkultur wesentlich geringere Anfangszelldichte vorteilhaft auf die Expression von Knorpelmarkern wie SOX9 (*Sry-related high-mobility-group box*) auswirkt (Bernstein et al. 2009a). Hinsichtlich der *in vitro* Erzeugung von Knorpel wird jedoch die Pelletkultur von diesen Autoren auch als effektiver angesehen (Bernstein et al. 2009b). Damit wird das Konzept der Trennung der beiden Phasen Redifferenzierung und Gewebeerzeugung in der Chondrogenese bestätigt. In diesem Zusammenhang sei noch einmal darauf hingewiesen, dass nach dem 3-Phasenmodell hergestellte Knorpelimplantate bereits erfolgreich zur Behandlung von Gelenkflächenschäden im Tierversuch genutzt wurden (Petersen et al. 2008).

### 5.2.3 Die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks während der Redifferenzierung

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Zytokinkombinationen auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten wurden sämtliche im Tiermodell erprobten Bedingungen konstant gehalten. Dazu gehörte auch ein im Vergleich zur Außenluft auf 5% reduzierter Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase. Allerdings wurden in einzelnen Fällen Vergleiche mit reduziertem und nicht reduziertem Sauerstoffpartialdruck gezogen, um den Effekt zu verifizieren.

Die Idee, dass die Redifferenzierung von Chondrozyten bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck profitiert, geht bereits auf Beobachtungen aus dem Jahre 1971 zurück. Brighton und Heppenstall wiesen hier den reduzierten Sauerstoffpartialdruck im Gewebe als Signal für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) nach (Brighton und Heppenstall 1971). Diese Beobachtung wurde auch experimentell zur Differenzierung der MSC genutzt (Robinson et al. 1993). Später wurde bekannt, dass die Sauerstoffreduktion in Chondrozytenkulturen auch unabhängig von Zytokinen als Redifferenzierungsfaktor fungiert (Domm et al. 2000 und 2002). Bemerkenswerterweise ist der Effekt nur während der Redifferenzierung in Alginat und nicht während der Proliferation in Monolayerkulturen nachweisbar. Andere Autoren konnten darüberhinaus zeigen, dass die Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks neben der Redifferenzierung in Alginat (Malda et al. 2004) auch einen positiven Einfluss auf die Aufrechterhaltung des differenzierten Phänotyps

des Chondrozyten unter *in vitro*-Bedingungen hat (Hansen et al. 2001). Bestätigt werden diese Beobachtungen durch neuere Untersuchungen, die mit molekularbiologischen Methoden gewonnen wurden. So lassen sich verschiedene knorpelspezifische Gene durch einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck aktivieren. Neben Transkriptionsfaktoren wie SOX9 (Lafont et al. 2008) und Zytokinen wie TGF- $\beta$  (Martin et al. 2004) sind dies vor allem Kollagen Typ II und verschiedene Metalloproteinasen (MMPs). Eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Differenzierung, Homöostase und Entwicklung des hyalinen Knorpels nimmt der Hypoxie-induzierte-Faktor (HIF) ein (Pfander und Gelse 2007, Lafont et al. 2007). Bemerkenswert ist auch, dass die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks im wesentlichen die Differenzierung der Zellen induziert, nicht aber die Synthese von extrazellulärer Matrix (Egli et al. 2008). Diese Beobachtungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit voll bestätigt, der Sauerstoffpartialdruck wurde deshalb grundsätzlich nur in den Alginatkulturen reduziert, nicht aber während der Knorpelsynthese in der anschließenden Pelletkultur. Der Effekt der Sauerstoffreduktion wurde im Versuch 4.4 überprüft. Der Vergleich der Analyseergebnisse der Alginatphase und der Pellets nach der Chondrogenese (Abschnitt 4.5.2) im 3-Phasen-Modell machte diesen besonders deutlich.

### 5.3 PDGF-Effekte auf die Redifferenzierung in Alginat

Die Idee zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen geht auf verschiedene Beobachtungen von Feyerabend in der Arbeitsgruppe zurück, die nahe legten, dass PDGF möglicherweise einen permissiven Effekt auf die Redifferenzierung von Chondrozyten hat. Wurden humane Chondrozyten unter anderem in Gegenwart von PDGF-BB proliferiert, so schienen sie davon weniger während der Vermehrung als in der späteren Phase der Chondrogenese zu profitieren (Feyerabend 2003). Da dieses Zytokin die Chondrogenese nicht direkt zu stimulieren vermochte, wurde ein Effekt auf die Redifferenzierung vermutet. So war es das Ziel dieser Arbeit, den möglichen Einfluss von PDGF-BB in Kombination mit den bisher allein applizierten Zytokinen IGF-I und TGF- $\beta_1$  auf die Redifferenzierung humaner Chondrozyten mit Hilfe der Alginattechnik zu untersuchen.

### 5.4 Messmethoden

Bei der Wahl der für die Beurteilung der Knorpelbildung geeigneten Parameter und des geeigneten Zeitpunktes für die Messungen im Rahmen der dreiphasigen Prozedur der Chondrogenese waren einander im Widerspruch stehende Kriterien zu berücksichtigen. Einerseits sollten die Messergebnisse zu einer nachhaltigen Aussage führen, andererseits stand für das Untersuchungsprogramm nur ein begrenzter Zeitrahmen zur Verfügung. Hinsichtlich der Wahl der Parameter für die

Chondrogenese wurde entschieden, die zellulären Syntheseraten der Glykosaminoglykane spektrophotometrisch und die Kollagenbildungsraten von Typ I und Typ II-Kollagen semiquantitativ durch Immunoblotting zu bestimmen. Auf die wesentlich aufwändigere Analyse der Genaktivität mittels der FISH-Technik oder der RT-PCR verschiedener Proteine einschließlich SOX9 wurde in diesem frühen Stadium der Untersuchungen zugunsten eines breiteren Messprogramms verzichtet. Inzwischen wurde die Technik weiterentwickelt und in anderem Zusammenhang auch auf die Redifferenzierung von Chondrozyten in Alginatekulturen angewandt (Bernstein 2009a u. 2009b, Tew et al. 2009). Hinsichtlich der Wahl des geeigneten Zeitpunktes der Messungen besteht zwar kein Zweifel, dass letztlich nur die nach Abschluss der dritten Phase der Knorpelbildung durchgeführten Messungen zu einer nachhaltigen Aussage führen. Doch wären die aufeinander aufbauenden Versuche bei einer Gesamtdauer von etwa neun Wochen im Einzelnen im gesteckten Zeitraum nicht durchführbar gewesen. Als optimaler Kompromiss wurde daher entschieden, den Großteil der grundlegenden Untersuchungen zunächst zeitsparend unmittelbar nach Abschluss der 21-tägigen Redifferenzierungsphase durchzuführen, um anschließend das so gewonnene vorläufige Ergebnis durch wenige gezielte Messungen nach Abschluss der dritten Phase der Chondrogenese zu bestätigen.

## 5.5 Hinweise aus der Analyse der Pseudochondrone

Der experimentelle Ansatz, aus der Analyse von Knorpelmarkern unmittelbar nach der Differenzierungsphase Rückschlüsse auf den Erfolg der Differenzierung ziehen zu können, beruht auf der Annahme, dass es neben der Aktivierung von knorpelspezifischen Genen auch schon teilweise zu deren Expression kommt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass sich während der Redifferenzierungsphase von den Zellen peripher deponiertes Material durch spezifische Anfärbung als glykosaminoglykanhaltig identifizieren ließ. Ähnliche Hinweise kommen von anderen Autoren, die die Alginatekulturtechnik als Alternative zur Chondrogenese in der Pelletkultur untersucht haben (Bernstein 2009a).

Eindrucksvoll bestätigt wird diese Hypothese schließlich durch die Ergebnisse der zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Messungen. In praktisch allen Fällen, in denen der Gehalt an Glykosaminoglykanen (GAG) zu Beginn und nach 21-tägiger Redifferenzierung verglichen wurde, kam es zu einem erheblichen Anstieg (Versuche 4.1 – 4.4). Im einzelnen gibt es dabei auch signifikante zytokinabhängige Unterschiede. Während IGF-I und PDGF-BB deutlich die GAG-Synthese zu unterstützen scheinen, hat TGF- $\beta_1$  generell eine dosisabhängig hemmende Wirkung. Dabei ist es besonders bemerkenswert, dass sich dieser negative Effekt auf die GAG-Synthese beschränkt, während die Synthese des Kollagens Typ II deutlich von der Gegenwart dieses Zytokins profitiert. Dieses Verhalten der Chondrozyten ist offensichtlich ein Spezifikum der Alginatekultur. So wird zum Beispiel in Pelletkulturen ein stimulie-

render synergistischer Effekt von IGF-I und TGF- $\beta_1$  hinsichtlich der Kollagen- und GAG-Syntheseraten berichtet (Goepfert 2007, Yaeger et al. 1997). Die hemmende Wirkung des TGF- $\beta_1$  auf die GAG-Synthese im Alginatgel kann zwar teilweise durch die Gegenwart von PDGF kompensiert werden, doch werden wiederholt höhere GAG-Syntheseraten in der Kontrolle (ohne Zusatz von Zytokinen) gemessen (siehe Versuch 4.3). Versuche, die TGF- $\beta_1$ -Konzentration möglichst niedrig anzusetzen oder nur für eine begrenzte Zeit einzusetzen, führten nicht wesentlich weiter, da diese mit einer Abnahme der Synthese des Kollagens Typ II einhergingen. Als Fazit für die Analyse der Pseudochondrone kann festgehalten werden, dass auf TGF- $\beta_1$  in der Redifferenzierungsphase nicht verzichtet werden sollte. Im Sinne einer optimalen Stimulierung beider Knorpelmarker erwies sich die Kombination aus allen drei untersuchten Zytokinen (PIT) als am wirkungsvollsten.

Nach Fertigstellung der experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich inzwischen auch andere Autoren mit dem Einsatz von PDGF zur Unterstützung der Knorpelbildung im Rahmen des *Tissue Engineering* beschäftigt hatten. So beschreiben beispielsweise Hsieh-Bonassera et al. die Verwendung von PIT in einem vergleichbaren Alginatgel-Modell (Hsieh-Bonassera et al. 2009). Wolf et al. setzen PDGF in Kombination mit TGF- $\beta$  und bFGF in einem System ein, bei dem Chondrozyten vor der Pelletkultur in Alginat aggregiert werden (Wolf et al. 2008).

## 5.6 Effekt der PIT-stimulierten Redifferenzierung auf die Knorpelsynthese in der Pelletkultur

Wie bereits erwähnt, können die Ergebnisse der Analysen der Pseudochondrone nur als Hinweise gewertet werden, die einer Verifizierung durch eine Analyse der in der Pelletkultur gebildeten Knorpelproben bedürfen. Dies ist in Form eines Vergleiches geschehen und im Abschnitt 4.5 dokumentiert. Um die Bedeutung der Redifferenzierungsphase hervorzuheben, wurde der Effekt der Zytokinkombinationen PIT auf die Knorpelbildung in Pelletkulturen ohne und mit eingeschobener Redifferenzierungsphase gegenübergestellt. Da in diesem Zusammenhang auch die Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks eine entscheidende Rolle spielt, wurde auch dieser Parameter bei der Konzeption des Experiments berücksichtigt.

Zunächst zur Kontrolle ohne gesonderte Redifferenzierungsphase: Der Ansatz sieht den direkten Einsatz frisch proliferierter Chondrozyten in der Pelletkultur vor, wie er in der Literatur als Modell zur *ex vivo* Herstellung von Knorpel empfohlen wird (Bernstein 2009b) und im Grunde auch den Bedingungen der ACI entspricht. Im Abschnitt 4.5.1 ist dargestellt, dass die Knorpelbildung während der 21-tägigen Kultivierung deutlich von der Gegenwart der Zytokinkombination profitiert. Die makroskopische Größe und der Gehalt an Glykosaminoglykanen hat sich im Vergleich zur Kontrolle (ohne PIT) annähernd verdoppelt, die Menge an Kollagen Typ II ist ebenfalls angestiegen. Da die Chondrogenese in der Pelletkultur im Gegensatz zur

Redifferenzierung nicht von einer Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks profitiert, wurde die „direkte“ Chondrogenese beim Sauerstoffpartialdruck der Außenluft (20%) durchgeführt.

Nun zur Chondrogenese nach gesonderter 21-tägiger Redifferenzierung: Das in Abschnitt 4.5.2 dokumentierte Experiment schließt einen Vergleich mit und ohne Zusatz der Zytokinkombination PIT, sowie mit und ohne Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks ein. Wie bei der „direkten“ Chondrogenese erweist sich der Zusatz der PIT-Kombination als deutlich stimulierend. Allerdings wirkt sich der PIT-Effekt auf die makroskopische Größenzunahme nur bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck aus. Auch die Zunahme der GAG-Syntheserate profitiert stärker unter diesen Bedingungen von der Gegenwart der PIT-Kombination. Hinsichtlich der Kollagensynthese wird für den Typ II ebenfalls eine deutliche PIT-abhängige Zunahme beobachtet, die allerdings nicht vom gewählten Sauerstoffpartialdruck abhängig zu sein scheint. Damit konnten die an den Pseudochondronen erhobenen Befunde zwar im wesentlichen bestätigt werden, wenn auch im einzelnen Unterschiede festzustellen sind.

So wird der überragende Effekt der Zytokinkombination PIT erst bei der Analyse der Pellets sichtbar. Bei der Bildung der Pseudochondrone während der Redifferenzierung lag die GAG-Synthese ohne Zusatz der Zytokinkombination PIT noch höher. Dies muss letztlich als Warnung verstanden werden, die Ergebnisse der Analysen der Pseudochondrone wirklich nur als vorläufige Hinweise zu verstehen. Neben Kollagen Typ II als Marker für hyalinen Knorpel wurde stets auch die Bildung des Typs I mitgemessen, ohne dass daraus wichtige Schlüsse gezogen werden konnten. Kollagen Typ I wird *in vivo* nur dann gebildet, wenn der Knorpel versucht, mechanische Schäden durch Narbenbildung zu kompensieren, ohne dabei seine biomechanischen Eigenschaften tatsächlich regenerieren zu können (*Scarring*-Reaktion). Möglicherweise treten die Signale für die *Scarring*-Reaktion im Rahmen der *in vitro* Chondrogenese ständig auf. Im Tierversuch hat sich gezeigt, dass sie die Funktionalität der Knorpelimplantate nicht signifikant zu beeinträchtigen scheinen (Petersen et al. 2008).

Als Fazit der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen kann die Zytokinkombination PIT ohne Einschränkung zur Unterstützung der *ex vivo* Knorpelbildung empfohlen werden. Der Vergleich der Ergebnisse mit und ohne gesonderte Redifferenzierungsphase lieferte auf den ersten Blick zwar sehr ähnliche Effekte. Wirklich wichtig aber sind die deutlichen quantitativen Unterschiede. Um hier tatsächlich einem quantitativen Vergleich standzuhalten, wurden für die im Abschnitt 4.5.1 und 4.5.2 dokumentierten Daten Zellen aus derselben Zellpopulation verwendet. Damit ist ein direkter quantitativer Vergleich der GAG-Syntheseraten in der Pelletkultur ohne und mit gesonderter Redifferenzierung möglich (Abb. 4.25 vs. 4.28). Betrachtet man nun die auf den DNA-Gehalt der Zellen bezogene zelluläre Syntheseleistung (GAG/DNA-Quotient), so steigt sie allein als Folge der Redifferenzierung unter den optimierten Bedingungen von einem Wert von unter zwei auf etwa 14 an. Dieser rund siebenfache Anstieg dokumentiert besonders eindrucksvoll den Erfolg der

Anwendung des 3-Phasenmodells zur extrakorporalen Knorpelbildung mit dem Ziel der Herstellung von Knorpelimplantaten für die chirurgische Therapie von Gelenkflächenschäden bei jungen Patienten.

## 6 Zusammenfassung

Gelenkknorpel zeigt bei Verletzung und Degeneration kaum intrinsisches Potenzial zur *restitutio ad integrum*. Moderne Therapieverfahren versuchen dieses Defizit durch Transplantation von autologen Chondrozyten bzw. *in vitro* generierten Knorpelimplantaten zu kompensieren. Beide Therapieansätze leiden unter dem Mangel eines Verfahrens zur *in vitro* Vermehrung isolierter humaner Chondrozyten unter Erhalt des differenzierten Phänotypus, eine essentielle Voraussetzung für die intra- und extrakorporale Bildung von hyalinem Knorpelgewebe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, den während der *in vitro*-Proliferation eintretenden Verlust der Eigenschaften des differenzierten Chondrozyten (Dedifferenzierung) durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart einer geeigneten Zytokin-Kombination wieder rückgängig zu machen (Redifferenzierung). Um die Redifferenzierung gezielt durch Behandlung mit geeigneten Zytokinen unterstützen zu können, ohne gleichzeitig andere zelluläre Leistungen der Zelle, wie Zellteilung und Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten, zu beeinflussen, wurde in einem sogenannten 3-Phasen-Modell gearbeitet. Es ermöglicht unter anderem die Vermeidung einer vorzeitigen Initiierung der Matrixbildung vor Abschluss der Redifferenzierung. Praktisch wird dies erreicht durch temporäre Einbettung der Zellen in ein Alginatgel, was die Stimulierung der von Zell-Zell-Kontakten abhängigen Matrixsynthese verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe einer Zytokinkombination, bestehend aus IGF-I, TGF- $\beta_1$  und PDGF-BB, gelingt, die im Gel eingebetteten Zellen im Laufe von 21 Tagen soweit zu redifferenzieren, dass sie in der anschließenden Synthesephase in der Lage sind, deutlich mehr Knorpelmarker zu produzieren als Zellen, die nicht diesem Differenzierungsprotokoll unterworfen waren. Während mit der semiquantitativen Immunoblot-Technik ein signifikanter Anstieg von Kollagen Typ II verzeichnet werden konnte, nahm die Syntheserate von Glykosaminoglykanen um den Faktor sieben zu. Neu ist in diesem Zusammenhang der erfolgreiche Einsatz von PDGF-BB in Kombination mit den bisher hauptsächlich eingesetzten Zytokinen IGF-I und TGF- $\beta_1$ , die ohne PDGF-BB bei humanen Chondrozyten nur marginale Effekte zeigen. Weiterhin wurde erstmals gezeigt, dass der positive Effekt des PDGF-BB auf die Redifferenzierung nur bei gleichzeitiger Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks auf 5% auftritt. Damit wird die Möglichkeit eröffnet, das am Tiermodell entwickelte 3-Phasenmodell in Zukunft auch für die Herstellung von Knorpelimplantaten aus humanen Chondrozyten junger Donoren zu nutzen.

## 7 Literaturverzeichnis

Aigner T, Stöve J (2003): Collagens–major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **55**:1569-1593.

Barbero A, Grogan S, Schäfer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I (2004): Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthr. Cartil.*; **12**:476-484.

Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I (2003): Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*; **48**:1315-1325.

Barlic A, Drobnic M, Malicev E, Kregar-Velikonja N (2008): Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J. Orthop. Res.*; **26**:847-853.

Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G (2005): Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br.*; **87**(5):640-5.

Bastiaansen-Jenniskens YM, Koevoet W, De Bart ACW, Zuurmond A-M, Bank RA, Verhaar JAN, DeGroot J, van Osch GJVM (2008): TGFbeta affects collagen cross-linking independent of chondrocyte phenotype but strongly depending on physical environment. *Tissue Eng. Part A*; **14**:1059-1066.

Benya PD, Shaffer JD (1982): Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*; **30**:215-224.

Bernstein P, Dong M, Graupner S, Corbeil D, Gelinsky M, Günther K-P, Fickert S (2009a): Sox9 expression of alginate-encapsulated chondrocytes is stimulated by low cell density. *J. Biomed. Mater. Res. A*; **91**:910-918.

Bernstein P, Dong M, Corbeil D, Gelinsky M, Günther KP, Fickert S. (2009b): Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnol Prog.*; **25**(4):1146-52.

- Blanco FJ, Geng Y, Lotz M (1995): Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.*; **154**:4018-4026.
- Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002): Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.*; **8**:73-84.
- Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P (1994): Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp. Cell Res.*; **212**:97-104.
- Böcker W, Denk H, Heitz Ph (1997). Pathologie. S. 45 ff. München Wien Baltimore: Urban und Schwarzenberg
- Brighton CT, Heppenstall RB (1971): Oxygen tension of the epiphyseal plate distal to an arteriovenous fistula. *Clin. Orthop.*; **80**:167-173.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.*; **331**:889-895.
- Brucker PU, Braun S, Imhoff AB (2008): Mega-OATS-Technik - autogene Knorpel-Knochen-Transplantation als Salvage-Verfahren bei großen osteochondralen Defekten am Femurkondylus. *Oper. Orthop. Traumatol.*; **20**:188-198.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC (1988): Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc. Rev.*; **1**:87-112.
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997a). Articular cartilage. Part I. Tissue design and chondrocytematrix interactions. *J Bone Joint Surg Am*; **79**:600-611.
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997b). Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg Am*; **79**:612-632.
- Chadjichristos C, Ghayor C, Herrouin J-F, Ala-Kokko L, Suske G, Pujol J-P, Galéra P (2002): Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio. *J. Biol. Chem.*; **277**:43903-43917.
- Chopra R, Anastassiades T (1998): Specificity and synergism of polypeptide growth

factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J. Rheumatol.*; **25**:1578-1584.

Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA (2001): Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J. Histochem. Cytochem.*; **49**:1211-1220.

D'Angelo M, Pacifici M (1997): Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum-free agarose cultures: a TGF-beta independent process. *J. Bone Miner. Res.*; **12**:1368-1377.

Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duance VC (2008): The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting adult articular cartilage repair: an in vitro study. *Tissue Eng. Part A*; **14**:1251-1261.

Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS (1995): Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.*; **53**:924-929.

Dimicco MA, Kisiday JD, Gong H, Grodzinsky AJ (2007): Structure of pericellular matrix around agarose-embedded chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.*; **15**:1207-1216.

Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B (2000): Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopade*; **29**:91-99.

Domm C, Schünke M, Christesen K, Kurz B (2002): Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthr. Cartil.*; **10**:13-22.

Dudhia J (2005): Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.*; **62**:2241-2256.

Egli RJ, Bastian JD, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M (2008): Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.*; **26**:977-985.

Feyerabend F (2003). Tissue Engineering von humanem Knorpel - Vorteile eines 3-Phasen in-vitro Modells. Dissertation rer. nat., Universität Hamburg.

Filová E, Rampichová M, Handl M, Lytvynets A, Halouzka R, Usvald D, Hlucilová

J, Procházka R, Dezortová M, Rolencová E, Kostáková E, Trc T, Stastný E, Koláčná L, Hájek M, Motlík J, Amler E (2007): Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res*; **56** Suppl 1:S5-S16.

Francioli S-E, Martin I, Sie C-P, Hagg R, Tommasini R, Candrian C, Heberer M, Barbero A (2007): Growth factors for clinical-scale expansion of human articular chondrocytes: relevance for automated bioreactor systems. *Tissue Eng.*; **13**:1227-1234.

Frazer A, Bunning RA, Russell RG (1994): Effects of transforming growth factor beta and interleukin-1 beta on [3H]thymidine incorporation by human articular chondrocytes in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*; **1226**:193-200.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003): Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **55**:1531-1546.

Gobbi A, Kon E, Berruto M, Francisco R, Filardo G, Marcacci M (2006): Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *Am J Sports Med*; **34**:1763-1773.

Göpfert C (2007). Knorpelherstellung aus Chondrozyten und mesenchymalen Vorläuferzellen für die Behandlung von Gelenkflächendefekten. Dissertation rer. nat., Technische Universität Hamburg-Harburg.

Guerne PA, Sublet A, Lotz M (1994): Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*; **158**:476-484.

Hansen U, Schünke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, Kurz B (2001): Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J. Biomech.*; **34**:941-949.

Hardingham TE, Fosang AJ (1992): Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*; **6**:861-870.

Haupt JL, Donnelly BP, Nixon AJ (2006): Effects of platelet-derived growth factor-BB on the metabolic function and morphologic features of equine tendon in explant culture. *Am. J. Vet. Res.*; **67**:1595-1600.

Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ (1994): Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.*; **107** ( Pt 1:17-27.

Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ (1996): Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am. J. Physiol.*; **271**:C742-752.

Henderson I, Francisco R, Oakes B, Cameron J (2005): Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee—a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years. *Knee.*; **12**(3):209-16.

Hock JM, Canalis E (1994): Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology*; **134**:1423-1428.

Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE (2008): Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.*; **90** Suppl 1:48-54.

Hsieh-Bonassera ND, Wu I, Lin JK, Schumacher BL, Chen AC, Masuda K, Bugbee WD, Sah RL (2009): Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*; **15**:3513-3523.

Jakob M, Démartheau O, Schäfer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I (2001): Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J. Cell. Biochem.*; **81**:368-377.

Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart ACW, Weinans H, Jahr H, Verhaar JAN, DeGroot J, van Osch GJVM (2006): Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. *Osteoarthr. Cartil.*; **14**:1136-1146.

Junqueira L und Carneiro J. (1996). S. 65ff Histologie. 4. Auflage. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York

Kamada H, Masuda K, D'Souza AL, Lenz ME, Pietryla D, Otten L, Thonar EJ-MA (2002): Age-related differences in the accumulation and size of hyaluronan in alginate culture. *Arch. Biochem. Biophys.*; **408**:192-199.

Kieswetter K, Schwartz Z, Alderete M, Dean DD, Boyan BD (1997): Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine*; **6**:257-264.

Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007): A randomized trial comparing autologous

chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*; **89**:2105-2112.

Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL (2008): Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.*; **283**:4778-4786.

Lafont JE, Talma S, Murphy CL (2007): Hypoxia-inducible factor 2alpha is essential for hypoxic induction of the human articular chondrocyte phenotype. *Arthritis Rheum.*; **56**:3297-3306.

Li T-F, O'Keefe RJ, Chen D (2005): TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front. Biosci.*; **10**:681-688.

Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Boyan BD (2000): Degree of differentiation of chondrocytes and their pretreatment with platelet-derived-growth factor. Regulating induction of cartilage formation in resorbable tissue carriers in vivo. *Orthopade*; **29**:120-128.

Löffler G und Petrides PE. (1998). Biochemie und Pathobiochemie. .5 Aufl. S. 735 ff. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York.

McQuillan DJ, Handley CJ, Campbell MA, Bolis S, Milway VE, Herington AC (1986): Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J.*; **240**(2):423-30.

Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J (2004): Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.*; **12**:306-313.

Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S (2005): Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin. Orthop.*:96-105.

Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vécsei V (2004): [Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results]. *Radiologe*; **44**:763-772.

Martin G, Andriamanalijaona R, Grassel S, Dreier R, Mathy-Hartert M, Bogdanowicz P, Boumédiène K, Henrotin Y, Bruckner P, Pujol JP (2004): Effect of hypoxia and reoxygenation on gene expression and response to interleukin-1 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*; **50**(11):3549-60.

- Mishima Y, Lotz M (2008): Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*; **26**:1407-1412.
- Mok SS, Masuda K, Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ (1994): Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J. Biol. Chem.*; **269**:33021-33027.
- Morales TI (1997): The role and content of endogenous insulin-like growth factor-binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*; **343**:164-172.
- Muir H (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*; **17**:1039-1048.
- Olney RC, Smith RL, Kee Y, Wilson DM (1993): Production and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins in bovine chondrocytes. *Endocrinology*; **133**:563-570.
- Olney RC, Wang J, Sylvester JE, Mougey EB (2004): Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **317**:1171-1182.
- Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, Adamietz P, Baumbach K, Stork A, Rueger JM, Poertner R, Amling M, Meenen NM (2008): Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med.*; **19**(5):2029-38.
- Petit B, Masuda K, D'Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, Morris NP, Uebelhart D, Schmid TM, Thonar EJMA (1996): Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Exp. Cell Res.*; **225**:151-161.
- Pfander D, Gelse K (2007): Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr. Opin. Rheumatol.*; **19**:457-462.
- Pridie KH (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br*; **41**:618-619
- Qi WN, Scully SP (1998): Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. *Exp. Cell Res.*; **241**:142-150.
- Resinger C, Vécsei V, Marlovits S (2004): Therapeutic options in the treatment of

cartilage defects. Techniques and indications. *Radiologe*; **44**:756-762.

Robinson, D., Efrat, M., Mendes, D.G., Halperin, N. und Nevo, Z. (1993). In vitro construction of cells containing implants for articular cartilage regeneration. In: *Joint destruction in arthritis and osteoarthritis*. Van Den Berg, W.B., Van Der Krann, P.M., P.L.E.M. Van Lent, P.L.E.M., Van Abonyi, J.L.E.M., Vandenberg, W.B. (eds.), Birkhäuser Verlag Basel, 231-235.

Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA (2007): Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.*; **15**:1367-1377.

Schalkwijk J, Joosten LA, van den Berg WB, van Wyk JJ, van de Putte LB (1989): Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. *Arthritis Rheum.*; **32**:66-71.

Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J (2002): Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr. Cartil.*; **10**:62-70.

Schulze M, Kuettner KE, Cole AA (2000): Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models. *Orthopade*; **29**:100-106.

Scully SP, Lee JW, PMA G, Qi W (2001): The role of the extracellular matrix in articular chondrocyte regulation. *Clin. Orthop.*:S72-89.

Seifner M (2006): Histologische und zellbiologische Analytik von Gelenkknorpel bei Osteochondrosis dissecans und Traumen bei der autologen Knorpelzelltransplantation. Med. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ (1999): Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem. J.*; **342** Pt 3:615-623.

Shikhman AR, Brinson DC, Lotz MK (2004): Distinct pathways regulate facilitated glucose transport in human articular chondrocytes during anabolic and catabolic responses. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; **286**:E980-985.

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR (1994): Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials*; **15**:451-456.

Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA (2001): Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem. J.*; **360**:461-470.

Tallheden T, Dennis JE, Lennon DP, Sjögren-Jansson E, Caplan AI, Lindahl A (2003): Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*; **85-A** Suppl:93-100.

Tew SR, Hardingham TE (2006): Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.*; **281**:39471-39479.

Tew SR, Peffers MJ, McKay TR, Lowe ET, Khan WS, Hardingham TE, Clegg PD (2009): Hyperosmolarity regulates SOX9 mRNA posttranscriptionally in human articular chondrocytes. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*; **297**:C898-906.

Thomopoulos S, Zaegel M, Das R, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Sakiyama-Elbert S, Gelberman RH (2007): PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res.*; **25**(10):1358-68

Trippel SB (1995): Growth factor actions on articular cartilage. *J. Rheumatol. Supplement*; **43**:129-132.

Villiger PM, Lotz M (1992): Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. *J. Cell. Physiol.*; **151**:318-325.

Wolf F, Candrian C, Wendt D, Farhadi J, Heberer M, Martin I, Barbero A (2008): Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur. Cell. Mater.*; **16**:92-99.

[www.g-ba.de/downloads/62-492-347/RL\\_QS-ACI-Knie\\_2009-04-23.pdf](http://www.g-ba.de/downloads/62-492-347/RL_QS-ACI-Knie_2009-04-23.pdf) [Stand: 20.01.2010 9:24h] .

Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM (1997): Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.*; **237**:318-325.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

- aqua dest.** destilliertes Wasser
- ACT** Autologe Chondrozyten Transplantation
- AP** Alkalische Phosphatase
- APS** Ammoniumperoxodisulfat
- bFGF** *Basic fibroblast growth factor*
- BMP** *Bone morphogenetic protein*
- DMEM** *Dulbecco's modified eagle medium*
- DMMB** 1,9-Dimethyl-Methlenblau-Chlorid
- DMSO** Dimethylsulfoxid
- DNA** Desoxyribonucleinsäure
- EDTA** Ethylendiamintetraacetat
- EGF** *Epidermal growth factor*
- EZM** extrazelluläre Matrix
- FKS** fötales Kälberserum
- GAG** Glykosaminoglykane
- GH** *Growth hormone*
- GDQ** GAG zu DNA - Verhältnis als Quotient
- HEPES** 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
- HCh 8** humane Gelenkchondrozyten vom Spender Nr. 8
- HIF** Hypoxie-induzierter Faktor
- ICRS** *International Society for Cartilage Repair*

- IGF-I** *Insulin-like growth factor I*
- IGFBP** IGF bindende Proteine
- IgG** Immunglobulin G
- JAA** Jodacetamid
- MACT** Matrixassoziierte autologe Chondrozyten Transplantation
- MAP** *Mitogen-activated protein*
- MMP** Matrix Metalloproteinase
- mRNA** Boten-Ribonucleinsäure
- OATS** *Osteochondral autograft transfer system*
- PBS** *Phosphate buffered saline*
- PZM** Perizelluläre Matrix
- PDGF-BB** *Platelet derived growth factor-BB*
- PGA** Polyglycolsäure
- PMSF** Phenylmethylsulfonfluorid
- SMAD** Homologe Proteine von „**mothers against decapentaplegic**“ (MAD) von *Drosophila melanogaster* und dem *Caenorhabditis elegans* Protein SMA. Der Name entspricht einer Kombination aus beidem.
- SOX9** *Sry-related high-mobility-group box*
- TEMED** N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
- TGF** *Transforming growth factor*
- TIMP** *Tissue inhibitor of metalloproteinases*
- TNF** - Tumor Nekrose Faktor
- TRIS** Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- U/min** Umdrehungen pro Minute

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Kollagen Zusammensetzung . . . . .	7
2.2	Hyaluronsäure . . . . .	9
3.1	Fibroblast-like Morphologie dedifferenzierter Chondrozyten . . . . .	26
3.2	Pseudochondrone nach der Elution aus Alginat . . . . .	28
3.3	WesternBlot . . . . .	31
4.1	GAG/DNA Analyse bei Untersuchung der Alginatdauer . . . . .	34
4.2	Kollagen Blot der Alginatdauer . . . . .	35
4.3	GAG/DNA Analyse – IGF-I . . . . .	36
4.4	Kollagen Blot – IGF-I ,Kollagen I . . . . .	37
4.5	Kollagen Blot – IGF-I ,Kollagen II . . . . .	38
4.6	GAG/DNA Analyse – TGF- $\beta_1$ . . . . .	39
4.7	Kollagen Blot – TGF- $\beta_1$ , Kollagen I . . . . .	40
4.8	Kollagen Blot – TGF- $\beta_1$ , Kollagen II . . . . .	40
4.9	GAG/DNA Analyse– PDGF-BB . . . . .	41
4.10	Kollagen Blot – PDGF-BB, Kollagen I . . . . .	42
4.11	Kollagen Blot – PDGF-BB, Kollagen II . . . . .	42
4.12	GAG/DNA Analyse – PDGF in Kombination . . . . .	43
4.13	Kollagen Blot – PDGF in Kombination, Kollagen I . . . . .	44
4.14	Kollagen Blot – PDGF in Kombination, Kollagen II . . . . .	45
4.15	GAG/DNA-Analyse – TGF in Kombination . . . . .	46
4.16	Kollagen Blot – TGF in Kombination . . . . .	47
4.17	GAG/DNA Analyse –TGF in zeitlich limitierter Supplimation . . . . .	48
4.18	Kollagen Blot – TGF in zeitlich limitierte Supplimation, Kollagen I . . . . .	49
4.19	Kollagen Blot – TGF in zeitlich limitierte Supplimation, Kollagen II . . . . .	49
4.20	GAG/DNA-Analyse – Faktoren in Kombination . . . . .	50
4.21	Kollagen Blot – Faktoren in Kombination . . . . .	51
4.22	GAG/DNA Analyse – Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks . . . . .	52
4.23	Kollagen Blot – Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks . . . . .	53
4.24	Knorpelpellets nach der direkten Chondroneogenese–ohne Alginatphase . . . . .	55
4.25	GAG/DNA Analyse der direkt erzeugten Pellets . . . . .	56
4.26	Kollagen Blot der direkt erzeugten Pellets . . . . .	57
4.27	Knorpelpellets – aus in Alginat redifferenzierten Chondrozyten . . . . .	58
4.28	GAG/DNA Analyse – Pellets aus redifferenzierten Chondrozyten . . . . .	59

4.29 Kollagen Blot – Knorpellets aus redifferenzierten Chondrozyten . . 60

## 9 Danksagung

Herrn PD Dr. Adamietz danke ich für die Heranführung an das Thema und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. Feyerabend und Frau Dr. Goepfert aus der Arbeitsgruppe Adamietz danke ich für die Unterstützung bei der Konzeptionierung der Versuche.

Herrn Dr. Schröder und Prof. Dr. Püschel (Institut für Rechtsmedizin) danke ich für das zur Verfügung Stellen der humanen Gelenkchondrozyten.

Den Mitarbeitern und den Spendern des Instituts für Transfusionsmedizin danke ich für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Humanserums.

Herrn Dr. Laudahn danke ich für die biometrische Beratung bei der statistischen Auswertung der Versuche.

Besonders danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium ermöglichten und mich stets unterstützten.

Diese Arbeit wurde finanziell durch Mittel des BMBF (Nr. 03N4012) und Biomet Merck BioMaterials GmbH (Darmstadt) gefördert.

## 10 Lebenslauf

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Nikolas Keilhack

Stade, 29. April 2010