

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling

Identifikation molekularer Marker des Gelenkknorpels

Dissertation

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

vorgelegt von:

Tim-Nicolas Hißnauer
aus Hamburg

Hamburg 2010

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.03.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Schinke

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. N. Meenen

Für meinen Großvater

Dr. med.

Dieter Müller-Scheven

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knorpelgewebe	1
1.1.2	Hyaliner Knorpel	2
1.1.3	Elastischer Knorpel	2
1.1.4	Faserknorpel	3
1.1.5	Wachstumsfugenknorpel	3
1.1.6	Gelenkknorpel	4
1.2	Erkrankungen des Gelenkknorpels: Arthrose	5
1.2.1	Ätiologie	5
1.2.2	Klinisches Bild	5
1.2.3	Epidemiologie	6
1.2.4	Pathogenese	6
1.3	Therapieoptionen der Arthrose	9
1.3.1	Konservative Therapieoptionen	9
1.3.2	Lavage, Shaving und Débridement	10
1.3.3	Die Mikrofrakturierung	10
1.3.4	Transplantation osteochondraler Zylinder	11
1.3.5	Tissue Engineering	11
1.3.6	Autologe Chondrozytentransplantation	12
1.4	Molekulare Marker von Knorpelzellen	13
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung	15

2	Material und Methoden	16
2.1	Schweine zur Isolierung der Chondrozyten	16
2.2	Isolierung von Wachstumsfugen- und Gelenkknorpel-Chondrozyten	16
2.3	Safranin-O- und Toluidinblau-Färbung	18
2.4	RNA-Isolation	18
2.5	cDNA-Synthese	19
2.6	Affymetrix Mikroarray Gen-Chip-Analyse	20
2.7	Gewebespezifische RT-PCR-Expressionsanalysen	20
2.8	DNA-Agarosegel-Elektrophorese	21
2.9	Generierung der RT-PCR Primer	22
2.10	Analysen des TE-Knorpels	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Isolation und molekulare Charakterisierung von Wachstumsfugen- und Gelenk Chondrozyten	25
3.2	Identifikation spezifischer molekularer Marker des Wachstumsfugen- und des Gelenkknorpels	29
3.3	Qualitätskontrolle von <i>in vitro</i> gezüchtetem TE-Knorpel	33
4	Diskussion	37
4.1	Optimierung des Tissue Engineerings von Gelenkknorpel	37
4.2	<i>ABI3BP</i>	38
4.3	<i>SIX1</i>	39
4.4	<i>GDF6</i>	40
4.5	<i>THBS4</i>	40
4.6	Fazit	41

5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	44
7	Danksagung	55
8	Lebenslauf	56
9	Anhang: Publikation	57
10	Eidesstattliche Versicherung	67

II Abkürzungsverzeichnis

<i>ABI3BP</i>	kodiert ABI Family Member 3 (NESH) Binding Protein
<i>ACAN</i>	Aggrecan
<i>ACT</i>	Autologe Chondrozytentransplantation
<i>ADAM</i>	Adamalysine
<i>ADAMTS-5</i>	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif, 5 Auch bekannt als: Aggrecanase-2
<i>ANGPT1</i>	kodiert Angiotensinogenase-1
<i>ALPL</i>	kodiert die nicht gewebespezifische Alkalische Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney)
<i>BFGF</i>	Basic Fibroblast Growth Factor
<i>BGN</i>	Biglycan
<i>BMP</i>	Bone Morphogenic Proteins
<i>BOR</i>	Branchio-oto-renalen Syndrom
<i>COL10A1</i>	kodiert die $\alpha 1$ Kette von Kollagen X
<i>COL2A1</i>	kodiert die $\alpha 1$ -Kette von Kollagen II
<i>COL14A1</i>	kodiert die $\alpha 1$ - Kette von Kollagen XIV
<i>COMP</i>	kodiert das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (auch bekannt als THBS5)
<i>COX-2</i>	Cyclooxygenase-2
<i>DCN</i>	Decorin
<i>EST</i>	Expressed Sequence Tag
<i>EZM</i>	Extrazellulärmatrix
<i>FMOD</i>	Fibromodulin
<i>GAG</i>	Glykosaminoglykan
<i>GAPDH</i>	kodiert für das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase. Es spielt bei der oxidativen Phosphorylierung in jeder Zelle eine Rolle und ist somit ein sog. Haushaltsgen
<i>GDF6</i>	kodiert den Wachstumsfaktor Growth Differentiation Factor 6
<i>HA</i>	Hydroxylapatit
<i>HGF</i>	Hepatocyte Growth Factor
<i>HRP</i>	Horseradish Peroxidase
<i>IHH</i>	Indian Hedgehog

IL-8	Interleukin-8
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 β
LUM	Lumican
MMP	Matrix-Metalloproteinase, z.B. MMP-13 (Matrix Metalloproteinase-13)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
NSAR	Nicht-Steroidale-Antirheumatika
PG	Proteoglykan
PGE2	Prostaglandin E2
<i>PRG4</i>	Proteoglykan 4, auch <i>SZP</i> (articular superficial zone protein)
<i>PTHrP</i>	Parathyroid Hormone 1 Receptor, kodiert den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ1 und bindet PTHrP
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Protein, ein Parathormon-verwandtes Peptid, Ligand des PTH/PTHrP-Rezeptors
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>SIX1</i>	kodiert den Transkriptionsfaktor Sine Oculis Homeobox Homolog 1
<i>SOX9</i>	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9, ein Transkriptionsfaktor
SYSADOA	Symptomatic Slow-acting Drugs In Osteoarthritis
TE-Knorpel	tissue-engineered Knorpel, <i>in vitro</i> synthetisierter Knorpel
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
<i>THBS4</i>	kodiert Thrombospondin-4, zu den Thrombospondinen gehören THBS1 bis THBS5 (COMP)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Knorpelgewebe

Das Knorpelgewebe bildet zusammen mit dem Knochengewebe im menschlichen Skelettsystem das Stützgewebe des Körpers. Es besteht aus Chondrozyten und Extrazellulärmatrix, welche sich hauptsächlich aus Proteoglykanen, vorwiegend vom Typ des Aggrecans (ACAN), und Kollagenfibrillen zusammensetzt. Die Moleküle der Extrazellulärmatrix werden vom Chondroblasten, der Vorläuferzelle des Chondrozyten, und dem Chondrozyten selbst sezerniert und vernetzen sich im Extrazellulärraum systematisiert. Viele ACAN-Monomere bilden dabei mit Hilfe des Glykosaminoglykans Hyaluronan und dem sogenannten Verbindungsprotein große Aggregate, die mit den Kollagenfibrillen vernetzt sind (Martel-Pelletier et al., 2008). Ein Chondrozyt bzw. eine Gruppe von Chondrozyten wird schalenartig vom sogenannten Knorpelhof, einer Zone der Intrazellulärschicht, die reich an Proteoglykanen ist und sich aufgrund ihrer Basophilie intensiver mit basischen Farbstoffen anreichert, umgeben. Eine Knorpelzelle bzw. eine Knorpelzellgruppe bildet samt dem Knorpelhof eine funktion-morphologische Einheit, die als Chondron bezeichnet wird. Die Chondrone werden je nach Knorpelart von kollagenen oder elastischen Fasern bzw. von straffem, zugfestem Bindegewebe und den Proteoglykan-Aggregaten umgeben, was dem Knorpel die mechanischen Eigenschaften der Zugfestigkeit und der Druckelastizität verleiht. Im Skelettsystem werden drei Knorpelarten voneinander unterschieden: Hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel.

Außer im Primordialskelett, einem aus hyalinem Knorpel bestehenden, temporären Knorpelskelett, welches im Rahmen der chondralen Ossifikation verknöchert, ist Knorpelgewebe frei von Nerven und Gefäßen. Die Mehrheit der aus hyalinem und elastischem Knorpel bestehenden Strukturen sind von einer festen, bindegewebsartigen und gefäßenthaltenden Knorpelhaut, dem Perichondrium, umgeben. Von hier aus erfolgt die Versorgung der Chondrozyten mittels Diffusion durch die Extrazellulärmatrix. Eine Ausnahme bildet dabei der Gelenkknorpel, der kein Perichondrium besitzt und daher über die Gelenkflüssigkeit, die Synovia, versorgt wird.

1.1.2 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist das am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe im adulten und im fetalen Organismus. Als Gelenkknorpel ist der hyaline Knorpel vorwiegend auf die mechanische Belastung ausgerichtet, während er in der Wachstumsfuge das Zentrum des Längenwachstums bildet. *In vivo* stellt sich der hyaline Knorpel makroskopisch als milchig trübes, derbes und durchscheinendes Gewebe dar. Die Histologie ist durch ovale, oft in Gruppen liegende Chondrozyten und eine stark basophile Matrix gekennzeichnet. Das Perichondrium des hyalinen Knorpels fängt zum einen Zugkräfte ab, die bei Biegung auf den Knorpel einwirken, zum anderen enthält es mesenchymale Zellen, welche zu Chondroblasten differenzieren können und so ein appositionelles Wachstum ermöglichen.

Neben seinem Vorkommen als Gelenkknorpel (*Cartilago articularis*) und als Wachstumsfugenknorpel in den Knorpelfugen des Knochens, kommt der hyaline Knorpel an zahlreichen weiteren Stellen des humanen Skelettsystems vor: Er verstärkt im Atemwegs-System die Wandabschnitte der luftleitenden Wege (Nase, Schild- und Ringknorpel des Kehlkopfes, Trachea und Bronchien), bildet im knöchernen Thorax die Sternum- und Bogenabschnitte der Rippen (*Cartilago costalis*), findet sich am Schulterblatt (*Cartilago Scapulae*) und bildet als Gelenkknorpel eine reibungsfreie Oberfläche in den Gelenken. Das Kiefer- und das Sternoklavikulargelenk bilden eine Ausnahme, in diesen erfolgt die Artikulation über Faserknorpel. Hyaliner Knorpel bildet während der embryonalen Entwicklung das Primordialskelett (Ausnahme: Schädeldach, Gesicht und Schlüsselbein), das während der fetalen und postnatalen Entwicklung verknöchert (Drenckhahn, 2003).

1.1.3 Elastischer Knorpel

Die Extrazellulärmatrix (EZM) des elastischen Knorpels ist grundsätzlich wie die des hyalinen aufgebaut, sie beinhaltet allerdings zusätzlich eine weitere Matrixkomponente, die elastischen Fasern. Diese ziehen in das Perichondrium hinein, was den elastischen Knorpel sowohl druck- als auch biege-elastisch macht. *In vivo* stellt sich der elastische Knorpel abhängig von der Menge der eingelagerten Fasern mehr oder weniger gelblich dar. Des Weiteren ist er weniger zellreich als hyaliner Knorpel.

Der elastische Knorpel befindet sich an verschiedenen Stellen des menschlichen Körpers. Im Ohr befindet er sich in der Ohrmuschel, im äußeren Gehörgang und in der Tuba auditiva. Am Kehlkopf findet sich der elastische Knorpel in der Epiglottis (Kehldeckel) in Form der sog. Cartilagine corniculatae und cuneiformes (kleine Kehlkopfknorpel) vor. In der Lunge ist er Bestandteil der kleinsten Bronchien (Drenckhahn, 2003).

1.1.4 Faserknorpel

Dieser Knorpeltyp vereint durch die zusätzliche Einlagerung von straffem Bindegewebe in die Knorpelmatrix die zwei mechanischen Eigenschaften Zugfestigkeit und Druckelastizität. Im Vergleich zu den beiden anderen Zelltypen ist der Faserknorpel weniger zellreich. Faserknorpel befindet sich im menschlichen Skelettsystem in folgenden Strukturen: Discus intervertebralis (Zwischenwirbelscheiben); Symphysis pubica (Schambeinfuge); Disci articulares (Zwischengelenkscheibe, z.B. am Kiefergelenk); Menisci articulares (Menisken), chondral-apophysäre Sehnenansätze; Druckzonen von Gleitsehnen (Drenckhahn, 2003).

1.1.5 Wachstumsfugenknorpel

Als Wachstumsfuge wird die Fuge zwischen der Epi- und der Metaphyse der Röhrenknochen bezeichnet. Sie besteht aus hyalinem Knorpel und ist der Ort des Längenwachstums in Form der enchondralen Ossifikation. Die Wachstumsfuge unterteilt sich in vier verschiedene Zonen, in denen sich Chondrozyten verschiedener Differenzierungsstadien befinden:

- Ruhe- oder Reservezone
- Proliferationszone
- Prähypertrophe Zone
- Hypertrophe Zone

In der Ruhezone befinden sich runde, vereinzelt auftretende Chondrozyten, die sich nur sehr selten teilen. Diese Zone ist dadurch charakterisiert, dass die extrazelluläre Knorpelmatrix sehr reich an Proteoglykanen und Typ II-Kollagen ist. Obwohl Teile dieser Zone mitotisch inert sind, fungieren andere Teile als Stammzellreservoir (Karaplis, 2002).

Im Rahmen ihrer Differenzierung werden die Chondrozyten dieser Zone flach und ordnen sich in der Proliferationszone in longitudinalen Säulen an. Die Chondrozyten sind mitotisch aktiv und sezernieren eine Matrix, die reich an Typ II-Kollagen und Typ XI-Kollagen ist (Ballock et al., 2003). Schließlich hören die Zellen auf zu proliferieren, vergrößern sich, verlieren ihr diskoide Form und erreichen die prähypertrophe Zone.

Diese prähypertrophen Chondrozyten nehmen weiter an Volumen zu, sezernieren eine an Typ X-Kollagen reiche Matrix und erreichen schließlich den hypertrophen Differenzierungsgrad (Hypertrophe Zone), in welchem sie in die sogenannte Chondroptose - einen der Apoptose ähnlichen Zustand – übergehen (Roach et al., 2004). Die Longitudinalsepten um die Chondrozyten kalzifizieren und bilden die primäre Spongiosa, die in der Folge von Osteoklasten resorbiert wird, um im Anschluss von Osteoblasten durch trabekulären Knochen ersetzt zu werden (Karaplis, 2002).

1.1.6 Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel des humanen Skelettsystems ist hyalin und bedeckt als ein spezialisiertes, konnektives Gewebe die Gelenkflächen von Diarthrosen. Der artikuläre Knorpel dient vorwiegend als krafttragendes Material, das auf die Druckbeanspruchung in den Gelenken ausgelegt ist und im Rahmen der hohen mechanischen Belastung eine absorbierende Funktion einnimmt (Martel-Pelletier et al., 2008). Seine anatomische Besonderheit definiert sich im Wesentlichen über vier biologische Faktoren: Avaskularität, keine Innervation, keine Lymphgefäße und die Ernährung über Diffusion (Buckwalter et al., 1997).

Morphologisch lässt sich der Gelenkknorpel in vier verschiedene Zone aufteilen:

- Superficialzone
- Transitionalzone
- Radiärzone
- Zone des mineralisierten Knorpels

Zwischen den ersten drei dieser Zonen existieren keine scharfen Grenzen (Martel-Pelletier et al., 2008).

1.2 Erkrankungen des Gelenkknorpels: Arthrose

Die Arthrose ist eine Erkrankung des Gelenkes, die einen progressiven Verlust der Gelenkfunktion verursacht (Krasnokutsky et al., 2008). Im Rahmen der Arthrose kommt es dabei nicht ausschließlich zu einer Degeneration des Gelenkknorpels, vielmehr sind alle Strukturen des Gelenkes, einschließlich des subchondralen Knochens, der Synovialis (Gelenkschleimhaut), der Menisci sowie des Kapsel-Band- und Muskelapparates betroffen (Graverand-Gastineau et al., 2009).

1.2.1 Ätiologie

Die Arthrose entwickelt sich immer aus einem Missverhältnis zwischen der tatsächlichen Belastung und der Belastungsfähigkeit eines Gelenkes. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang zwischen den primären Arthrosen, denen eine oft unbekannt Minderwertigkeit des Knorpelgewebes zugrunde liegt, und den sekundären Arthrosen. Die degenerativen Veränderungen, die im Rahmen einer sekundären Arthrose entstehen, entwickeln sich in Folge bekannter Ursachen:

- Überbelastung und Trauma
- Entzündliche Gelenkprozesse, z.B. im Rahmen von bakteriellen Arthritiden oder Rheumatoider Arthritis
- Metabolische Erkrankungen, z.B. Gicht, Chondrokalzinose
- Endokrine Erkrankungen, z.B. Hyperparathyreoidismus, Hypothyreose

1.2.2 Klinisches Bild

Die Leitsymptome der Osteoarthrose sind (Härle und Fleck 2008):

- Gelenkschmerz, der auch in die benachbarten Gelenkstrukturen bzw. in entfernte Gelenke projiziert werden kann
- Schwellung
- Muskelverspannung
- Bewegungseinschränkung
- Zunehmende Deformität des Gelenkes

1.2.3 Epidemiologie

Arthrose ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit, man geht davon aus, dass es 100 Millionen Betroffene gibt. Alleine in den USA haben 21 % aller Erwachsenen Arthrose (Helmick et al., 2008; Lawrence et al., 2008). Für Deutschland wurde im Bundes-Gesundheitssurvey, einer Querschnittsstudie der Bevölkerung durch das Robert-Koch-Institut in Berlin, erstmals seit der Wiedervereinigung die Prävalenz der Arthrose in der gesamtdeutschen Bevölkerung erfasst. Dabei ergab sich bei einer Stichprobengröße von 6205 Personen für die 18 – 79-jährigen eine Gesamtprävalenz einer Arthrose an mindestens einer Gelenkregion von 27,7 %. Während bei den < 30-jährigen nur jeder Zwanzigste Arthrose aufweist, trifft dieses bei den > 60-jährigen für jeden Zweiten zu (Schneider et al., 2005). In der BRD werden die daraus resultierenden direkten Kosten auf 3,5 - 5,4 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt. Das entspricht ungefähr 3 % der gesamten direkten Krankheitskosten (Willlauschus et al., 1995).

1.2.4 Pathogenese

Auch wenn die Pathogenese der Arthrose bis heute noch nicht vollends geklärt ist und ein ursächliches Initialereignis für die Gelenkdegeneration im Rahmen einer primären Arthrose noch unbekannt, müssen zum näheren Verständnis der pathogenetischen Mechanismen nicht nur der Gelenkknorpel, sondern vielmehr das Zusammenspiel zwischen Knorpel, subchondralem Knochen und Synovialis betrachtet werden. Der kontinuierliche Verlust des Gelenkknorpels im Verlauf der Arthrose ist das Resultat eines Ungleichgewichtes in der Balance zwischen Matrixsynthese und Matrixdegradation des Knorpelgewebes. Im Verlauf der Erkrankung überwiegen letztendlich die degradativen den anabolen und regenerativen Prozessen, sodass sich eine progressive Gelenkzerstörung einstellt (Martel-Pelletier et al., 2008).

Sowohl Chondrozyten als auch Synoviozyten von Arthrose-Patienten produzieren vermehrt inflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und den Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), was zu einer Abnahme der anabolen Kollagensynthese und einer Synthesezunahme kataboler Mediatoren, wie den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) führt. Darüber hinaus kommt es in der Folge zu einer

vermehrten Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren wie z.B. Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-6 (IL-6), Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickstoffmonoxid (NO) (Krasnokutsky et al., 2007; Pelletier JP et al., 2001).

Im Rahmen der Arthrose werden diese degradativen und destruktiven Prozesse außerdem durch biomechanische Störungen beeinflusst. So können beispielsweise eine Fettleibigkeit oder durch Achsenfehlstellungen hervorgerufene Fehlbelastungen der Gelenke die Entstehung der Arthrose begünstigen und beschleunigen. So konnte gezeigt werden, dass in der Arthrose beobachtete biomechanische Veränderungen auch bestimmte biochemische Effekte induzieren und potenzieren können: Statische und dynamische Kompression des Gelenkknorpels führen in diesem Zusammenhang zur verstärkten Expression verschiedener Moleküle, wie z.B. Aggrecan, Fibromodulin (FMOD), Matrix-Metalloproteinasen und der Aggrecanase-2 (ADAMTS-5) (Lee et al., 2005; Fitzgerald et al., 2006). Von dem Molekül ADAMTS-5, eine Matrix-Metalloproteinase, die Aggrecane degradiert, konnte gezeigt werden, dass seine Deletion im Arthrose-Mausmodell die Degradation des murinen Gelenkknorpels unterbindet (Glasson et al., 2005).

Darüber hinaus induziert mechanischer Stress einen Anstieg der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion sowie der NO-Synthase durch die Chondrozyten (Fermor et al., 2001). NO fördert die Degradation des Gelenkknorpels durch Inhibition der Kollagen- und Proteoglykan-Synthese und die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (Krasnokutsky et al., 2008). Andere, durch oxidativen Stress entstehende, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) begünstigen katabolische Prozesse und Matrixdegradation im Knorpel. In verschiedenen Publikationen wird diskutiert, ob die in der Arthrose auftretende Apoptose und Seneszenz der Chondrozyten aus einer verstärkten NO- und ROS-Freisetzung resultieren könnte (Afonso et al., 2007; Loeser et al., 2006; Kim et al., 2007; Blanco et al., 1998).

Als Synovialis wird die innere Membran der Gelenkkapsel (auch Gelenkinnen- oder Gelenkschleimhaut) bezeichnet. Obwohl die Arthrose lange als eine nicht-inflammatorische degenerative Gelenkerkrankung eingestuft wurde, weist ihr klinisches Bild mit den Symptomen Schwellung und Erguss auf eine Entzündung hin (Krasnokutsky et al., 2008). Heute ist bekannt, dass es bereits in den frühen Stadien der Arthrose zu einer zunächst symptomlosen Synovialitis (Entzündung der Synovialis) kommen kann. In arthroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass

bis zu 50 % der untersuchten Arthrose-Patienten inflammatorische Veränderungen an der Synovialis aufwiesen (Ayril et al., 1996). Zwar produzieren die Chondrozyten die überwiegende Anzahl der Knorpel-destruktiven Moleküle, aber auch die Synoviozyten (Zellen der Synovialis) sezernieren Chemokine und Metalloproteinasen, die an der Degradation und Inflammation im Gelenk beteiligt sind. Die Synoviozyten werden in diesem Zusammenhang durch die in Folge mechanischer oder enzymatischer Destruktion freigesetzten Knorpel-Abbauprodukte zur Sekretion stimuliert. Es kommt zur Angiogenese und Entzündung, die sich gegenseitig bedingen: Makrophagen wandern ein, produzieren pro-angiogenetische Faktoren und stimulieren Endothelzellen sowie Fibroblasten zur Sekretion von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und bFGF (Vascular Endothelial Growth Factor und Basic Fibroblast Growth Factor). Diese begünstigen wiederum Angiogenese und Inflammation (Bonnet et al., 2005).

Zwar ist der Einfluss des subchondralen Knochens auf die Schädigung des Gelenkknorpels im Rahmen einer Arthrose noch nicht vollends aufgedeckt, allerdings wird angenommen, dass er eine Art Schlüsselrolle in der Pathogenese der Gelenkdegeneration einnehmen könnte (Martel-Pelletier et al., 2008). Eine mögliche Hypothese ist, dass auch der subchondrale Knochen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Eikosanoide freisetzt, die in den Metabolismus des Gelenkknorpels eingreifen. So könnte das vermehrte Vorkommen von MMP-13 in den basalen Schichten des arthrotischen Gelenkknorpels dadurch erklärt werden, dass seine Synthese vom subchondralen Knochen durch den Transforming Growth Factor- β (TGF- β) verstärkt induziert wird (Moldovan et al., 1997; Massicotte et al. 2002). Sowohl von MMP-13 als auch von Cathepsin K konnte gezeigt werden, dass es in enchondrale Ossifikation und Gelenkknorpel-Degradation involviert ist (Konttinen et al., 2002; Nakase et al., 2000).

Im Rahmen der Arthrose konnte eine verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine und von PGE₂/LTB₄ durch subchondrale Osteoblasten gezeigt werden, was einen degradierenden Effekt auf die dem subchondralen Knochen aufliegenden Gelenkknorpel-Schichten zur Folge hat. Auch der Hepatocyte Growth Factor (HGF) wird durch subchondrale Osteoblasten in der Arthrose vermehrt sezerniert. Dadurch kommt es, vermutlich über die Induktion einer verstärkten MMP-13-Synthese, zur

Schädigung der basalen Gelenkknorpel-Schichten (Reboul et al., 2001; Moldovan et al., 1997).

1.3 Therapieoptionen der Arthrose

1.3.1 Konservative Therapieoptionen

Zu den nicht-medikamentösen Therapiemaßnahmen zählen Basismaßnahmen wie Körpergewichtsreduktion, Bewegungs- und Kräftigungsprogramme sowie der Einsatz von Orthesen zur Gelenkstabilisierung. Im Rahmen der Pharmakotherapie der Arthrose stehen die Schmerzlinderung und Entzündungshemmung im Vordergrund. Im Rahmen der systemischen medikamentösen Therapie kommen Analgetika, wie NSARs (nicht-steroidale-Antirheumatika), selektive COX-2-Hemmer und Opiode zum Einsatz. Neben diesen Medikamenten existiert noch eine weitere, bislang wenig etablierte Medikamentengruppe, die strukturelle Arthroseprozesse beeinflussen soll, die SYSADOAs (Symptomatic Slow-acting Drugs In Osteoarthritis). Zu dieser Medikamentengruppe gehören Glukosamine, Chondroitine und Diacereine (Härle und Fleck 2008). Während für die Glukosamine und Chondroitine kein signifikanter Unterschied zum Placebo nachgewiesen werden konnte (Clegg et al., 2006), führte die Behandlung von Arthrose-Patienten mit Diacerein, welches über die Hemmung der Interleukin-1-Freisetzung und Inhibition der MMPs wirkt, zur Schmerzreduktion und zur Besserung der Beweglichkeit (Rintelen et al., 2006). Zur lokalen medikamentösen Therapie, die auf der intraartikulären Injektion beruht, werden Glukokortikoide und verschiedene Hyaluronsäurepräparate eingesetzt. Glukokortikoide führen hierbei zur signifikanten Schmerzreduktion der Betroffenen, jedoch konnte kein funktionsverbessernder Effekt gezeigt werden (Bellamy et al., 2006). Die Injektionstherapie mit Hyaluronsäure ist umstritten, zeigte aber einen verzögerten, jedoch länger anhaltenden symptomatischen Effekt (Härle und Fleck 2008).

1.3.2 Lavage, Shaving und Dèbridement

Zu den traditionellen Behandlungsmethoden begrenzter Läsionen des Gelenkknorpels und beginnender Arthrosen zählen die Lavage (Spülung), das Shaving (Abtragen lokaler Knorpelauffaserungen) und das Dèbridement (Knorpelglättung) des betroffenen Gelenkes. Durch die Lavage soll es zu einer Minderung lokaler Entzündungsmediatoren kommen, Shaving und Dèbridement sollen durch den Gelenkknorpelschaden entstandene Inkongruenzen der artikulierenden Gelenkflächen ausgleichen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob das Dèbridement den Effekt der Lavage verbessern kann. Für Patienten mit einer gesicherten Arthrose ist allenfalls eine Reduktion des Schmerzes und der Schwellung mittels Lavage, Shaving und Dèbridement beschrieben (Jackson et al., 2003). Die Wirksamkeit dieser Techniken wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert, da kein Schmerz reduzierender Effekt im Vergleich zur Placebo-Gruppe gezeigt werden konnte (Moseley et al., 2002).

1.3.3 Die Mikrofrakturierung

Das Prinzip der Mikrofrakturierung beruht auf der operativen Eröffnung des subchondralen Knochens. Hierbei soll die Einsprossung mesenchymaler Knochenmarkszellen in den Defektbereich stimuliert und die Bildung eines als Ersatzknorpel fungierenden fibro-cartilaginösen Gewebes induziert werden. Eine motorisierte Anbohrung (Pridie- bzw. Becksche Bohrung) zur Eröffnung der subchondralen Lamelle findet heutzutage weniger klinische Anwendung, da diese oft zu thermischen Schäden des Gewebes geführt hat. Im Unterschied zur Anbohrung des Knochens werden bei der Mikrofrakturierung verschiedene Ahlen zur manuellen Perforation eingesetzt. Der klinische Nutzen der Mikrofrakturierung ist umstritten, da das den Defekt ausfüllende Granulationsgewebe als mechanisch minderwertig beschrieben wurde. Es konnte lediglich eine temporär begrenzte Verbesserung der Beschwerden, in der Spätfolge sogar eine Verschlechterung der Symptome gezeigt werden (Smith et al., 2005).

1.3.4 Transplantation osteochondraler Zylinder

Die Technik der osteochondralen Transplantation wurde erstmals 1964 für die Osteochondrosis dissecans beschrieben (Wagner, 1964). Erst 1993 wurden die ersten Ergebnisse mit autologen osteochondralen Zylindern veröffentlicht (Matsusue et al., 1993). Diese Technik basiert auf der Entnahme autologer Knorpel-Knochen-Zylinder aus mechanisch weniger belasteten Gelenkarealen und dem Transfer in die Defektzone. Man unterscheidet die Transplantation eines einzelnen oder einiger weniger Zylinder, welche den Defekt vollständig ausfüllen von der sog. Mosaikplastik, bei der zur Wiederherstellung einer intakten Gelenkfläche zahlreiche kleine Zylinder transplantiert werden. Bei der Mosaikplastik wird das Defektareal jedoch nicht vollständig ausgefüllt, zwischen den einzelnen Zylindern verbleiben Lücken, die durch die Einsprossung mesenchymaler Knochenmarkszellen aus dem subchondralen Knochen aufgefüllt werden und eine Art Ersatz-Knorpel bilden (Smith et al., 2005). Als ein Vorteil der Transplantation osteochondraler Zylinder gilt, dass der Defekt durch autologen, originären Knorpel ersetzt wird. Die Erfolgsraten liegen bei etwa 70 %, bezogen auf Defekte der medialen oder lateralen Femurkondyle im Knie (Emmerson et al., 2007). Für den patellofemorale Bereich hingegen ist es schwierig, die Zylinder kongruent in das Defektareal einzupassen und zu fixieren (Bentley et al., 2003). Zu den wesentlichen Nachteilen dieser Technik zählt die mangelnde Einheilung auf Knorpelniveau, da diese nur bindegewebig erfolgt. Die Gewinnung von gesundem, zur Reimplantation geeigneten Knorpel ist, bezogen auf die Zylinderanzahl, begrenzt, da man hierfür gesundes Gewebe, z.B. im Bereich der Fossa intercondylaris, schädigen muss. Da man eine potenzielle Arthroseinduktion an der Entnahmestelle vermutet, wird die empfohlene maximale Größe des Defektareals, die mittels autologer Zylindertransplantation versorgt werden kann, auf 1-4 cm² festgelegt (Hangody u. Füles, 2003).

1.3.5 Tissue Engineering

Da die beschriebenen Therapien hinsichtlich ihrer Indikation und ihres Erfolges begrenzt sind, beruhen große Hoffnungen auf dem Tissue Engineering. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld, das die Gesetzmäßigkeiten des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften mit dem Ziel vereint, einen biologischen Ersatzstoff zu entwickeln, welcher die Funktion eines Gewebes ersetzt, aufrecht

erhält oder verbessert. Das Tissue Engineering beruht auf drei, von Langer und Vacanti beschriebenen Säulen (Langer und Vacanti, 1993):

- Der Isolation von Zellen oder Zellersatzmaterialien
- Dem Einsatz gewebebildender Substanzen, z.B. Wachstumsfaktoren
- Der Verwendung von Matrices als Trägermaterial, in oder auf welchen die Zellen transplantiert werden können

Um einen funktionellen Gelenkknorpelersatz zu gewinnen, der im Rahmen einer Arthrose implantiert werden kann, muss zunächst Gelenkknorpel in Form einer Biopsie aus einem weniger belasteten Gelenkareal entnommen werden. Nach der Isolation von Gelenkknorpel-Chondrozyten mittels Kollagenase-Verdau kommt es während der anschließenden Vermehrung der Zellen *in vitro* über mehrere Passagen zur De-differenzierung der Zellen, d.h. sie verändern ihren Phänotyp zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen und produzieren in weitaus geringerem Maße das für hyalinen Knorpel typische Typ II-Kollagen. Zur Re-differenzierung der Zellen können Mediumzusätze in Form von Serum oder Wachstumsfaktoren genutzt werden (Domm et al., 2000). Nach 4 bis 6 Wochen der Chondrozyten-Vermehrung *in vitro*, können die Zellen in das Defektareal eingebracht werden. Zur Implantation können sie dabei entweder bereits auf bzw. in implantierbaren Trägermaterialien kultiviert oder durch Trypsinierung wieder in Suspension gebracht werden. Eine weitere Möglichkeit der matrixgekoppelten Transplantation ist die Überführung der Zellen in eine dreidimensionale Matrix, die eine kalkulierbare Zelldichte ermöglicht. In der Klinik finden zahlreiche Biomaterialien zur Matrix-gekoppelten Transplantation Anwendung, wie z.B. Typ I/III-Kollagen Matrices.

1.3.6 Autologe Chondrozytentransplantation

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), erstmals 1989 im Großtierexperiment getestet (Grande et al., 1989), stellt die klassische Form der Chondrozytentransplantation und den ursprünglichsten Ansatz des Tissue Engineerings von Gelenkknorpel dar. Bei der Originalmethode, die 1994 von der Arbeitsgruppe um Mats Brittberg und Lars Peterson auch klinische Anwendung fand, wird die Defektzone über eine Mini-Arthrotomie debridiert und mit einem vom Tibiakopf entnommenen Periostlappen übernäht. Auf diese Weise wird ein Hohlraum zwischen Periostlappen und dem subchondralen Knochen geschaffen (Biochamber),

in den die Zellsuspension injiziert werden kann. Brittberg et al. publizierten 1994 erste klinische Ergebnisse von 23 Patienten, deren femoralen und patellaren Gelenkknorpeldefekte mittels ACT versorgt wurden. Bei der makroskopischen Beurteilung des Transplantats in Folgearthroskopien wiesen 16 Patienten gute bis exzellente Ergebnisse auf. Von 22 Proben der histologisch nachuntersuchten Biopsien konnte in 12 Fällen hyalin-artiger Knorpel nachgewiesen werden (Brittberg et al. 1994). Brittberg et al. postulierten in diesem Zusammenhang drei Erklärungsansätze zum Reparaturmechanismus:

- Die Chondrozyten unter den transplantierten Zellen könnten in der Lage sein, den Defektgrund zu besiedeln und eine hyaline Knorpelmatrix zu synthetisieren.
- Durch den direkten Kontakt zum Periost des Periostlappens wird die Replikation der transplantierten Chondrozyten stimuliert.
- Periost und die transplantierten Zellen stimulieren die Chondrozyten in der Umgebung sowie die Zellen in den tiefen, kalzifizierten und nicht-kalzifizierten Schichten des Gelenkknorpels zur Einwanderung in das Defektareal und initiieren auf diese Weise die Reparatur des Defektes.

Zwar kommt die ACT heutzutage bei entsprechender Indikation in modifizierter Form zur klinischen Anwendung, allerdings ist sie mit typischen Komplikationen assoziiert (Niemeyer et al., 2008). So bildet sich in vielen Fällen anstelle eines beständigen und festen hyalinen Knorpels nur ein bindegewebsartiges und biomechanisch minderwertiges Ersatzgewebe (Roberts et al., 2001).

1.4 Molekulare Marker von Knorpelzellen

Das Haupt-Makromolekül der Knorpelmatrix ist Typ II-Kollagen. Es besteht, wie alle Kollagene, aus drei Polypeptidketten, welche durch ihre strukturelle Interaktion eine sog. Tripelhelix bilden. Mutationen im *COL2A1* (kodiert α 1-Kette von Typ II-Kollagen) können z.B. zum Stickler Syndrom, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung mit pathologischen Veränderungen der Augen und der Gelenke, führen (Ahmad et al., 1991). Typ XI-Kollagen ist ein weiteres, knorpelspezifisches Kollagen. Mutationen in den Genen *COL11A1* und *COL11A2* (kodieren die α 1- und α 2-Ketten von Typ XI-Kollagen) resultieren in Erkrankungen, bei welchen der Knorpel mitbetroffen ist und ebenfalls im Stickler-Syndrom (Byers, 2001). Verschiedene Mutationen in den

knorpelspezifischen Typ IX-Kollagen-Genen *COL9A1*, *COL9A2* und *COL9A3* (kodieren die α 1-, α 2- und α 3-Ketten von Typ IX-Kollagen) führen zu multiplen epiphysealen Dysplasien (Byers, 2001). Typ X-Kollagen ist ein spezifischer molekularer Marker für die hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge. Mutationen im *COL10A1* (kodiert α -1-Kette von Typ X-Kollagen) führen zu verschiedenen Formen der metaphysealen Dysplasie (Bateman, 2001).

Weitere molekulare Marker von Knorpelzellen sind die verschiedenen Proteoglykane (PGs). Die PGs sind Matrixproteine aller Binde- und Stützgewebe, an welche mindestens eine Kette aus Glykosaminoglykan (GAG) kovalent gebunden ist. Ein typisches PG des Knorpels ist das Aggrecan (ACAN), welches in Interaktion mit Hyaluronan große PG-Aggregate bildet und dem Knorpel osmotische, für die mechanische Belastbarkeit benötigte, Eigenschaften verleiht. Weitere typische PGs des Knorpels sind z.B. Decorin (DCN), Biglycan (BGN), Fibromodulin (FMOD) und Lumican (LUM) (Martel-Pelletier et al., 2008).

Am Knorpelmatrix-Umbau sind verschiedene Proteasen, z.B. die MMPs beteiligt. Die in Knorpelzellen primär exprimierte Matrix-Metalloproteinase ist MMP3, welches am Abbau von Typ IX-Kollagen beteiligt ist (Okada et al., 1989). Von den Matrix-Metalloproteasen MMP1, MMP8 und MMP13 wurde beschrieben, dass sie im Falle der Arthrose verstärkt in Chondrozyten exprimiert werden (Reboul et al., 1996). Eine weitere Gruppe der MMPS sind die Adamalysine (ADAM), zu denen die Aggrecanasen (ADAMTS) gehören. Zwei dieser Proteine werden im Knorpel exprimiert, ADAMTS-4 und ADAMTS-5, wobei vom ADAMTS-5 beschrieben wurde, dass es wesentlich an der arthrotischen Knorpeldegradation beteiligt ist (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005).

Zu den klassischen molekularen Markern der Wachstumsfugen-Chondrozyten gehört neben *COL10A1* auch *PTH1R*. *PTH1R* kodiert für den Typ I-PTH/PTHrP-Rezeptor und bindet PTHrP, ein Parathormon-verwandtes Peptid, das von terminal differenzierten Chondrozyten synthetisiert wird und von zentraler Bedeutung für die enchondrale Ossifikation ist. Es stimuliert die Proliferation von Chondrozyten und verzögert über den Transkriptionsfaktor *SOX9* deren hypertrophe Differenzierung. Der Wachstumsfaktor IHH (Indian Hedgehog), der spezifisch in Chondrozyten exprimiert wird, die gerade die Proliferation gestoppt haben, stimuliert die PTHrP-Synthese und beeinflusst mittels dieses Rückkopplungs-Mechanismus die Geschwindigkeit der Ossifikation (Kronenberg et al., 2006).

Während zahlreiche allgemeine molekulare Marker der verschiedenen Knorpel-Typen bekannt sind und die funktionelle Wichtigkeit einiger dieser Gene für die Chondrozyten der Wachstumsfuge in der Literatur beschrieben wurde, konnten bislang fast keine für den Gelenkknorpel spezifischen Marker identifiziert werden. Bislang wird lediglich von PRG4 (Proteoglykan 4) angenommen, dass es spezifisch von Chondrozyten der oberen Gelenkknorpel-Schichten und Synoviozyten, den Zellen der Synovialis, synthetisiert wird (Schumacher et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass es in der Synovia (Gelenkflüssigkeit) durch den Abbau von auf den Gelenkknorpel wirkenden Spannungs Kräften einen chondro-protectiven Effekt haben könnte (Jay et al., 2007). Mutationen im humanen *PRG4*-Gen führen zum sog. CACP-Syndrom (Camptodactyly-Arthropathy-Coxa vara-Pericarditis-Syndrom), einer autosomal-rezessiven Erbkrankheit, die sich an verschiedenen Gelenkregionen manifestiert und zu einer Entzündung des Herzbeutels führen kann (Marcelino et al., 1999).

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In Zusammenarbeit mit Dr. T. Streichert aus dem Institut der Klinischen Chemie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) sollte eine Mikro-Array-Analyse durchgeführt werden, in der das molekulare Expressionsprofil von Gelenkknorpel- gegenüber Wachstumsfugenknorpelzellen simultan und quantitativ erfasst werden kann. Da es bislang keine etablierten Marker für Gelenkknorpel- gegenüber Wachstumsfugenknorpelzellen gab, sollten auf diesem Wege molekulare Expressionsunterschiede detektiert, vor allem aber spezifische Marker des Gelenkknorpels identifiziert werden.

Im nächsten Schritt sollte *in vitro* synthetisiertes Knorpelgewebe untersucht werden. Die Arbeitsgruppe von PD Dr.-Ing. Pörtner aus dem Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik (Technische Universität Hamburg-Harburg) stellte uns hierfür freundlicher Weise den *in vitro* generierten Knorpel zur Verfügung. Dieser sollte nun einerseits histologisch charakterisiert, andererseits hinsichtlich seiner Expression der zuvor identifizierten spezifischen molekularen Marker untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Schweine zur Isolierung der Chondrozyten

Schweine, sog. Mini Pigs, mit einem mittleren Gewicht von 30 kg und einem durchschnittlichen Alter von 4 Wochen, wurden von dem Betrieb Christian Schlesier in Kleinerkmannsdorf bei Radeberg bezogen, wobei drei Einzellieferungen jeweils drei amtstierärztlich voruntersuchte Schweine umfassten. In der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden die Schweine unter standardisierten Bedingungen, in angemessenem Lagerstreu und unter jederzeit freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter, gehalten.

Zur Tötung wurde den Tieren zunächst zum Narkotisieren 2 ml Ketamin Gräub® (100 mg/ml, Wirkstoff Ketaminhydrochlorid) intramuskulär appliziert. Im Anschluss wurde zur Verstärkung der Narkose wahlweise das Medikament Rompun® (Wirkstoff Xylazin) oder Sedaxylan® (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid), ebenfalls intramuskulär, injiziert. Mittels einer Herzpunktion mit 5 ml T61® (Kombinationspräparat mit 200 mg Embutramid, 50 mg Mebezonium und 5 mg Tetracain), das stark dämpfend auf das Atemzentrum im Hirnstamm wirkt, wurde der Tod der Tiere herbeigeführt.

2.2 Isolierung von Wachstumsfugen- und Gelenkknorpel-Chondrozyten

Mit einer Hohlraumfräse wurden aus den medialen und lateralen Kniegelenken der Schweine Knorpel-Knochen-Zylinder gewonnen, welche einen Durchmesser von 0,85 cm und eine durchschnittliche Länge von 3 cm hatten (Abb. 1). Um nicht-dekalzifizierte Histologien anzufertigen, wurden die gewonnenen Zylinder in Formaldehyd (4 % (v/v) in PBS) fixiert. Nach der anschließenden Dehydratation und Einbettung in Methylmethacrylat, wurden mit dem Mikrotom (Techno-Med) Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt, welche folgend histologisch gefärbt wurden. Außerdem wurden mittels Kollagenase-Verdau (Kollagenase Typ Ia aus *Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich) sowohl aus der Wachstumsfuge als auch aus dem Gelenkknorpel primäre Chondrozyten isoliert. Zunächst wurde hierfür ein dreißigminütiger Vorverdau in 0,1 %iger Kollagenase-Lösung (in DMEM/Ham's F12, 1:1; PAA Laboratories) bei Raumtemperatur im Schüttler durchgeführt.

Anschließend wurden die Knorpelgewebe zweimal mit dem Zellkulturmedium DMEM/Ham's F12 gewaschen, woraufhin sich ein Verdau in 0,2 %iger Kollagenase-Lösung (in DMEM/Ham's F12, 1:1) über 4 bis 5 Stunden bei 37 °C im Schüttler anschloss. Danach wurde die Suspension durch einen 40 µm Nylonfilter pipettiert und nachfolgend über 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte im Kulturmedium (DMEM/Ham's F12, 1:1), das mit 10 % fetalen Kälber Serum (FKS, Lonza), 100 µg/ml Na-Pyruvat und 1 % PenStrep (Penicillin und Streptomycin, Invitrogen) versetzt war. Nach dem Auszählen mit Hilfe der Zählkammer wurden die Zellen in einer 6-Well Gewebekulturplatte ausplattiert, wobei sich jeweils ca. 2×10^6 Zellen pro Well befanden. Die Kultivierung der Chondrozyten erfolgte über 10 Tage, dabei erfolgte der Wechsel des Zellkulturmediums alle 2-3 Tage.

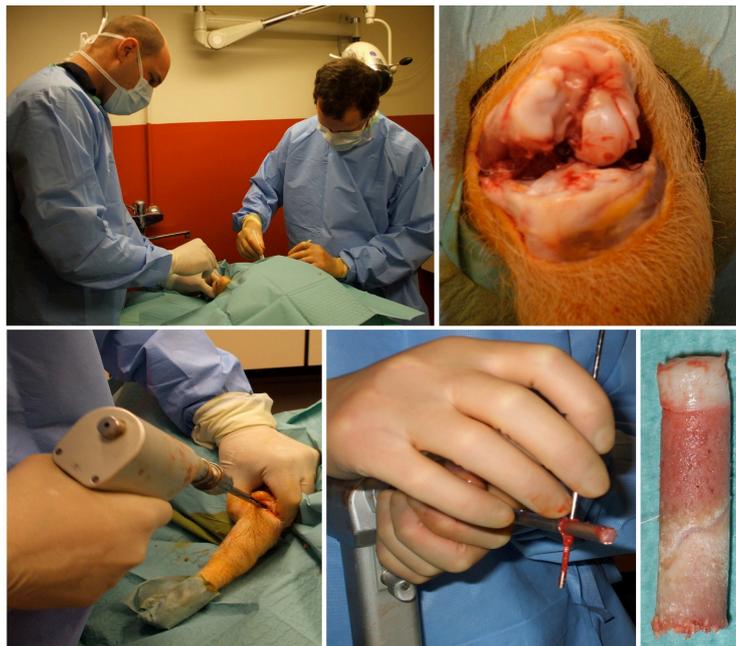


Abb. 1: Gewinnung von Knorpel-Knochen-Zylindern. Mit einer sogenannten Hohlraumfräse wurden aus den Kniegelenken von 4 Wochen alten Schweinen Knorpel-Knochen-Zylinder gewonnen.

2.3 Safranin-O- und Toluidinblau-Färbung

Zur histologischen Safranin-O- und Toluidinblau-Färbung wurde das Acrylat der vorliegenden Schnitte drei Mal für 10 Minuten mit 2-(Methoxyethyl)-azetat (Merck) herausgelöst, um im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % Ethanol bis 50 % Ethanol) bewässert zu werden. Zur Färbung wurden die Schnitte 5 Minuten mit 3 %iger Silbernitratlösung, 10 Minuten mit Aqua dest., 5 Minuten mit Sodaformollösung, 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser und 30 Minuten mit Toluidinblau-Lösung bzw. 60 Minuten mit Safranin-O-Lösung behandelt. Folgend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit DPX (Sigma Aldrich) eingedeckt.

2.4 RNA-Isolation

Für die nachfolgend geplanten Expressionsanalysen wurde die Gesamt-RNA zunächst aus den nativen Geweben (Konservierung bei -80 °C) isoliert. Nach einer ersten groben Zerkleinerung mit Hilfe eines Handmörser wurden Gelenk- und Wachstumsfugenknorpel anschließend in 14 ml-Gefäße (*Greiner bio-one*TM) gegeben, unter Zugabe von 1 ml TRIzol-Reagenz mit dem *Ultra Turrax*[®] Dispergiergerät (IKA-Werke, Deutschland) für ca. 20 Sekunden homogenisiert und anschließend auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Proben in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von jeweils 200 µl Chloroform unter intensivem Schütteln für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurde über 10 Minuten bei 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. 700 µl der oberen, wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und zur Ausfällung der RNA wurden jeweils 600 µl Isopropanol hinzugegeben. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit darauffolgender erneuter Zentrifugation in der Kältezentrifuge für 10 Minuten (12.000 rpm). Nach Abnahme des Überstands und Zugabe von 200 µl 70 % Ethanols wurde wiederum bei 4 °C und 12.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Resuspension des Pellets wurden 30 µl DEPC behandeltes H₂O verwendet und die Proben bei maximal 65° für 3 Minuten in den Heizblock gestellt.

Zur Isolation der RNA aus den kultivierten Primärzellen an Tag 10 der Differenzierung wurde das RNeasy[®] Mini Kit von *Qiagen*TM verwendet und streng

nach Protokoll vorgegangen. Auf die kultivierten Primärzellen wurden dabei in jedes Well einer 6-Well-Platte 200 μl eines Lysepuffers gegeben. Das Lysat wurde anschließend auf eine sog. Qiashreder-Säule gegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumenanteil 70 % Ethanol versetzt. Bis zu 700 μl des Gemisches wurden anschließend auf eine Qiasäule gegeben und für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule unter Zentrifugation mit den Waschpuffern RW1 und RPE gewaschen. Zur Elution der RNA wurden 25 μl DEPC behandeltes Wasser verwendet. Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte im Nano Drop Spectrophotometer ND-100 (peqlab).

2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript® III First-Strand Kit von Invitrogen durchgeführt. Die Vorgehensweise richtete sich dabei streng nach dem entsprechenden Protokoll: Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 15 μg der RNA eingesetzt, welche für die nachfolgende Gen-Chip-Hybridisierung verwendet werden sollte. Dafür wurden dem entsprechende Volumen der RNA-Lösungen jeweils 1 μl *Oligo-(dT)-Primer* (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl 10 mM dNTP mix zugesetzt und mit DEPC behandeltes H_2O auf 10 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die RNA/Primer-Mixtur inkubierte anschließend bei 65 °C für 5 Minuten im Heizblock, es folgte der Transfer auf Eis, wo die Proben mindestens für eine Minute abkühlten. In einem separaten Reaktionsgefäß wurde derweil ein Gemisch vorbereitet, das folgende Komponenten umfasste (Angaben für jeweils eine Reaktion):

- 2 μl 10 RT-Puffer
- 4 μl 25 mM MgCl_2
- 2 μl M DTT
- 1 μl RNaseOUT™ (40 U/ μl)

Im Anschluss wurden jeweils 9 μl dieses Reaktionsgemisches der RNA/Primer-Mixtur zugesetzt, gemischt und durch kurzes Anzentrifugieren gesammelt. Es folgte ein

Inkubationsschritt für 2 Minuten bei 42 °C im Thermoblock. Danach wurde jedem Reaktionsansatz zur reversen Transkription jeweils 1 µl *SuperScript™II RT* hinzugefügt und die Ansätze für 50 Minuten bei 42 °C im Thermoblock inkubiert. Zur Terminierung der Reaktion folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C und anschließend wiederum der Transfer auf Eis. Abschließend wurde jedes Reaktionsgemisch mit 1 µl RNase H versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.6 Affymetrix Mikroarray Gen-Chip-Analyse

Die Proben wurden im Anschluss an Dr. T. Streichert aus dem Institut der Klinischen Chemie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) gegeben, wo eine Affymetrix Mikroarray Gen-Chip-Analyse durchgeführt wurde. Für die Expressionsanalyse wurden porkine U74v2 Gen-Chips, welche 24.000 Gene und sogenannte expressed sequence tags (ESTs) umfassen, verwendet.

2.7 Gewebespezifische RT-PCR-Expressionsanalysen

Zur Durchführung der RT-PCR-Expressionsanalyse wurden die zu untersuchenden Gewebe ebenfalls aus den 4 Wochen alten Schweinen gewonnen. Die Analyse stützte sich dabei auf native Gewebeproben, die einerseits aus Gelenk- und Wachstumsfugenknorpel, andererseits aus den Organen Leber, Herz, Milz, Magen, Gehirn und Niere stammten. Die RNA-Isolation wurde wie zuvor beschrieben (siehe 2.4) durchgeführt, außerdem erfolgte ein DNase-Verdau.

Der DNase-Verdau wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von *Qiagen™* durchgeführt. Dafür wurden die Proben zunächst mit DEPC behandeltem H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Von dem zuvor mit β-Mercaptoethanol angesetzten Lysispuffer (RLT-Puffer: 10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml RLT-Puffer) wurden im Anschluss 350 µl der Probe hinzugefügt. Anschließend wurde ein gleicher Volumenanteil (450 µl) 70 % Ethanol hinzugegeben und das Gemisch auf eine sogenannte Qiasäule gegeben. Dann wurden die Proben für 15 Sekunden bei maximal 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl des RW1-Puffers zum Waschen auf die Säule gegeben. Zum DNase-Verdau wurden nachfolgend 10 µl DNase-Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer vermischt und auf die Säule gegeben, worauf sich eine

Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten anschloss. Nun wurden wiederum 350 μl des RW1-Puffers zum Waschen verwendet mit einer sich anschließenden Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und zweimal mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift wiederum für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Um die restlichen Ethanolreste zu entfernen wurde die Säule in einem neuen Auffanggefäß platziert und für 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Gefäß gestellt und die RNA in maximal 50 μl DEPC behandeltem H_2O unter einminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm von der Säule gelöst.

Für die cDNA-Synthese wurden pro Reaktion 100 ng RNA eingesetzt und streng nach Protokoll, wie unter 2.5 aufgeführt, vorgegangen. Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

- 1,5 -3 μl cDNA
- 2 μl PCR-Puffer (10x)
- 0,5 μl dNTP-Mix (5 mM)
- 3 μl spezifischer Primer (2 μM)
- 0,3 μl Taq-DNA-Polymerase
- DEPC behandeltes Wasser ad 20 μl Reaktionsvolumen

Die sich anschließende Inkubation erfolgte im Thermocycler (Eppendorf®, Hamburg). Die Konditionen für das PCR-Programm wurden dabei wie folgt gewählt:

1 Zyklus	4 Minuten bei 95 °C	(Initiale Denaturierung)
36 Zyklen	30 Sekunden bei 94 °C	(Denaturierung)
	30 Sekunden bei 55 °C	(Anlagerung der Primer)
	1 Minute bei 72 °C	(Elongation)
1 Zyklus	10 Minuten bei 72 °C	(Finale Elongation)

2.8 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Um das PCR-Produkt in einer Agarosegel-Elektrophorese anschließend nach der Fragmentgröße aufzutrennen, wurden zunächst 2 g Agarose (Seakem, 50004) in 100 ml 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen aufgeköcht, bis sich die Agarose

vollständig auflöste. Zur Anfärbung der DNA-Banden wurde das Gel vor dem Gießen unter dem Abzug mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma, C-0875) versetzt, dann in eine Gelform gegossen, in welche außerdem ein Kamm mit ca. 40 µl Taschenvolumen eingesetzt wurde. Nach Erkaltung des Gels wurde es in die mit 1 x TAE Puffer gefüllte Laufkammer gesetzt. Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde eine 1 kb-Leiter von Invitrogen als Größenreferenz mit aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 V wurden die Nukleinsäuren im Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

50 x TAE-Puffer: 242,0 g TRIS-Base
 57,1 g Essigsäure abs.
 8,6 g EDTA in 1000 ml H₂O

Dieser Puffer wurde zur Benutzung 50 x mit Wasser verdünnt.

2.9 Generierung der RT-PCR Primer

Die für die RT-PCR-Expressionsanalyse verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primerexpress 2.0 generiert und bei Eurofins Mwg/Operon bestellt. In den folgenden Tabellen 1, 2 und 3 sind die Primersequenzen der jeweiligen Primerpaare im Einzelnen aufgeführt.

Tab. 1: Forward- und Reverse-Primer, die für die RT-PCR-Expressionsanalyse zur Identifikation Wachstumsfugenknorpel-spezifischer Marker verwendet wurden (siehe Ergebnisse, Abb. 6).

Gen	Primer
<i>ALPL</i>	Forward-Primer: 5'-TTCAGAGGAGAGCTGGCATGT-3' Reverse-Primer: 5'-TGTCCCAAGCTCAGTCCTAAC-3'
<i>COL10A1</i>	Forward-Primer: 5'-GCTCCCATCCCCTTTGATAAGA-3' Reverse-Primer: 5'-AGCCTGATCCAGGTAGCCTTTG-3'
<i>PTH1R</i>	Forward-Primer: 5'-AAGTCCAGTGCCAATGTCCAG-3' Reverse-Primer: 5'-CTTTGGCGTCCATTACATCGT-3'
<i>COL2A1</i>	Forward-Primer: 5'-GGCCTCCCCGGAAGTC-3' Reverse-Primer: 5'-CCTCTCCGCGTCTTTC-3'

Tab. 2: Forward- und Reverse-Primer, die für die RT-PCR-Expressionsanalyse zur Identifikation Gelenknorpel-spezifischer Marker verwendet wurden (Ergebnisse, Abb. 8).

Gen	Primer
<i>ABI3BP</i>	Forward-Primer: 5'-CCATCTGGACTGAAAGACCCTT-3' Reverse-Primer: 5'-CCACAACTGGCAGTGATCTTC-3'
<i>THBS4</i>	Forward-Primer: 5'-ATCCAGGCGATCGAAATTCTG-3' Reverse-Primer: 5'-AGGTGTCCTATCGCTGGTTCCCT-3'
<i>SIX1</i>	Forward-Primer: 5'-CCAGCGTCCGGTCAAATTTAGT-3' Reverse-Primer: 5'-CCAGGTTGCCAGATTTGTTAC-3'
<i>COL14A1</i>	Forward-Primer: 5'-GTGGTTAAGGAGGACAAGCCCT-3' Reverse-Primer: 5'-TGCTGTGTATCCCTTAGCTCCG-3'
<i>PPA2B</i>	Forward-Primer: 5'-TGTGGTTACAGGTAGCCCTTT-3' Reverse-Primer: 5'-GGCAGTTCTTGGTAGGTTCTGC-3'
<i>PTGS1</i>	Forward-Primer: 5'-TGGAAGGCCACCAGAAATTTCT-3' Reverse-Primer: 5'-GGTGGTCTTGCTTGGTGTTC-3'
<i>TMEM30B</i>	Forward-Primer: 5'-GCGCGCATCCGCCAGGGCAA-3' Reverse-Primer: 5'-AGACGACCAGCATGACAAAG-3'
<i>ESP8</i>	Forward-Primer: 5'-CCTGCCTCCAATCAAGATCAA-3' Reverse-Primer: 5'-GAAATGTACCGTGCCACTTGC-3'
<i>SHISA3</i>	Forward-Primer: 5'-CGTTAACCACTGTACCACGACG-3' Reverse-Primer: 5'-AGACCTGCATGTCCAACGTTCC-3'
<i>GDF6</i>	Forward-Primer: 5'-TACTCCATCGCTGAGAAGCTG-3' Reverse-Primer: 5'-TGTGCGAGAGATCGTCTAGTCC-3'
<i>GP38K</i>	Forward-Primer: 5'-ACCGGCACCATGTAAGACATG-3' Reverse-Primer: 5'-CAAGTCAGGCTTTCAGAGGAT-3'
<i>GEM</i>	Forward-Primer: 5'-GAGCGTGGTTGGTGTTCACAT-3' Reverse-Primer: 5'-GGC AAT CCT AGC TCC ACG AAT-3'
<i>NF1-B3</i>	Forward-Primer: 5'-TATTCTTCTCCAGCCCCATC-3' Reverse-Primer: 5'-TGGACATTTGCCGGTAGGAT-3'
<i>NFIA</i>	Forward-Primer: 5'-ACCAGCTCAAAAAACCTGTGGA-3' Reverse-Primer: 5'-TGTTGTGAAACGAAACACCCC-3'
<i>MMP1</i>	Forward-Primer: 5'-ACCCCAAGGACATCCACAGAT-3' Reverse-Primer: 5'-CAACTTTGTTGCCAATCCCAG-3'
<i>HIST1H2AC</i>	Forward-Primer: 5'-TTTCAGAGCCCCCACTATTTCC-3' Reverse-Primer: 5'-CAGGTGCAGGATCAGTCAATGA-3'
<i>MAP2</i>	Forward-Primer: 5'-ATTCCAAGGTTCCAACATGCC-3' Reverse-Primer: 5'-CCAGCCATTGAAGAAATGCCT-3'
<i>GAPDH</i> (Haushaltsgen)	Forward-Primer: 5'-CTTCGTCAAGCTCATTTCTGG-3' Reverse-Primer: 5'-AGTCAGGAGATGCTCGGTGTG-3'

Tabelle 3: Forward- und Reverse-Primer, die für die RT-PCR-Expressionsanalyse der Thrombospondin-Gen-Familie verwendet wurden (Ergebnisse, Abb. 9).

Gen	Primer
<i>THBS1</i>	Forward-Primer: 5'-CCAGCAGCCGTTTCTATGTTGT3' Reverse-Primer: 5'-CCTATGTGACGAGGATCATGC3'
<i>THBS2</i>	Forward-Primer: 5'-GACGAGTTTGGGTCTGTGGA-3' Reverse-Primer: 5'-CCAGCGTAGGTTTGGTCATA-3'
<i>THBS3</i>	Forward-Primer: 5'-CAGGTACGACTGCTGTGGAC-3' Reverse-Primer: 5'-GGCACTGTGTCATTGCATCG-3'
<i>THBS5 (COMP)</i>	Forward-Primer: 5'-GGATGCCTGTGACAACTGTC-3' Reverse-Primer: 5'-AAGGCCCTGAAGTCGGTGAG-3'
<i>GAPDH</i> (Haushaltsgen)	Forward-Primer: 5'-CTTCGTCAAGCTCATTTCTGG-3' Reverse-Primer: 5'-AGTCAGGAGATGCTCGGTGTG-3'

2.10 Analysen des TE-Knorpels

Der *in vitro* gezüchtete Gelenkknorpel (TE-Knorpel, tissue engineered Knorpel) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr.-Ing. Pörtner aus dem Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik (Technische Universität Hamburg-Harburg) generiert und uns für unsere Analysen freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Zur Durchführung der histologischen Analyse der TE-Knorpel-Proben wurden diese in Formaldehyd (4 % (v/v) in PBS) fixiert. Nach der anschließenden Dehydratation und Einbettung in Methylnmethacrylat, wurden mit dem Mikrotom (Techno-Med) Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt und im Anschluss Safranin-O- und Toluidinblaugefärbt (siehe 2.3). Die immunhistologische Analyse wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Typ II-Kollagen (1:100, Acris) an nicht-dekalzifizierten Schnitten durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotynilierter Antikörper gegen Maus-IgG (Dako) angewendet, um die Schnitte im Anschluss mit dem Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) Konjugat (Dako) zum Beenden der Reaktion zu inkubieren. Um die Peroxidaseaktivität zu detektieren, wurde ein Peroxidase-Blockreagenz genutzt.

Zur Durchführung der RT-PCR-Expressionsanalysen des TE-Knorpels wurde zunächst wie unter 2.4 beschrieben RNA aus den Proben isoliert. Die Proben wurden dann mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von *Qiagen*TM einem DNase-Verdau unterzogen (siehe 2.7). Um die RNA in cDNA umzuschreiben wurde, wie unter 2.5 dargestellt, das SuperScript® III First-Strand Kit von *Invitrogen* genutzt, wobei jeweils 150 ng RNA pro Reaktion eingesetzt wurden. Die TE-Knorpelproben wurden auf die Expression der Gene *COL2A1*, *COL10A1*, *PTH1R*, *ALPL*, *ABI3BP*, *SIX1*, *GDF6* und *THBS4* untersucht, wobei die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Primer zur Anwendung kamen.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation und molekulare Charakterisierung von Wachstumsfugen- und Gelenk-Chondrozyten

Sowohl die Safranin-O- als auch die Toluidinblau-Färbung der aus den Schweinen gewonnenen Knorpel-Knochen-Zylinder zeigten intakten, durch den epiphysealen Knochen voneinander getrennten, Gelenk- und Wachstumsfugenknorpel (Abb. 2). Die klare Abgrenzung der beiden Knorpelgewebe ermöglichte es dabei, einerseits RNA aus den entsprechenden nativen Geweben zu isolieren, andererseits konnten die Chondrozyten aus Gelenk- und Wachstumsfugenknorpel durch Kollagenase-Verdau freigesetzt und *ex vivo* kultiviert werden. An Tag 10 der Differenzierung konnte dann RNA aus den entsprechenden Primärzellen gewonnen werden, die zusammen mit der nativen RNA für eine Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung eingesetzt wurde. Dieses ermöglichte, das Expressionsprofil beider Knorpelgewebe sowohl *in vivo* (natives Gewebe) als auch *in vitro* (kultivierte Primärzellen) von ungefähr 20.000 Genen simultan und quantitativ zu erfassen.

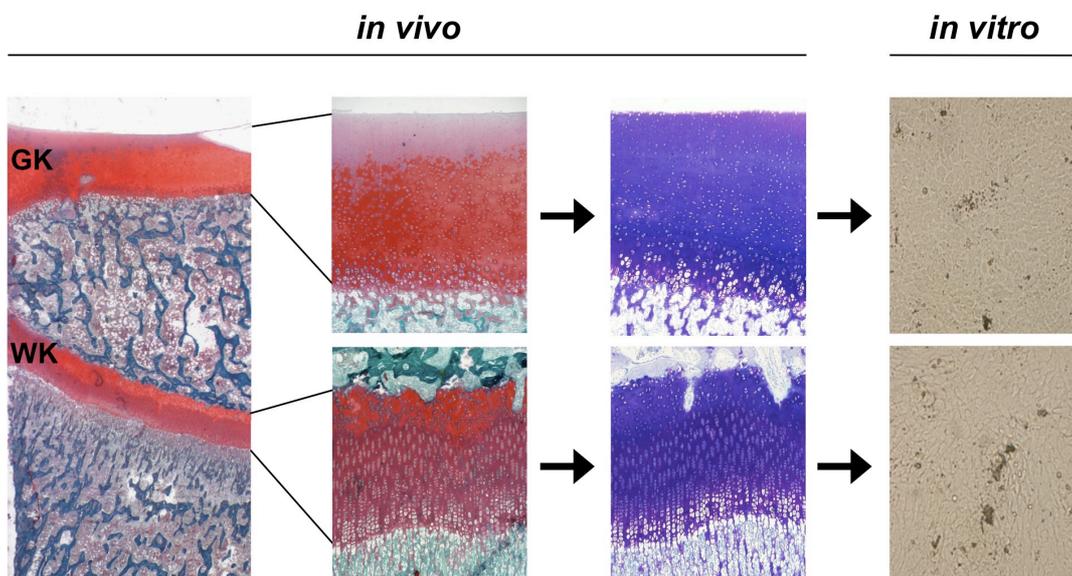


Abb. 2: Strategie zur Identifizierung Gelenkknorpel-spezifischer Marker. In der Safranin-O- und Toluidinblau-Färbung der Knorpel-Knochen-Zylinder können die beiden rot bzw. blau gefärbten Knorpelgewebe, Gelenkknorpel (GK) und Wachstumsfugenknorpel (WK), deutlich voneinander abgegrenzt werden. Aus beiden nativen Geweben sowie aus den entsprechenden kultivierten Primärzellen wurde RNA isoliert, die anschließend für eine Genom-weite Affymetrix-Expressionsanalyse eingesetzt wurde.

Die in der Gen-Chip-Analyse detektierten Gene konnten in 3 Gruppen eingeteilt werden (Abb. 3):

- Allgemeine Marker von Knorpelzellen
- Wachstumsfugenknorpel-spezifische Marker
- Gelenkknorpel-spezifische Marker

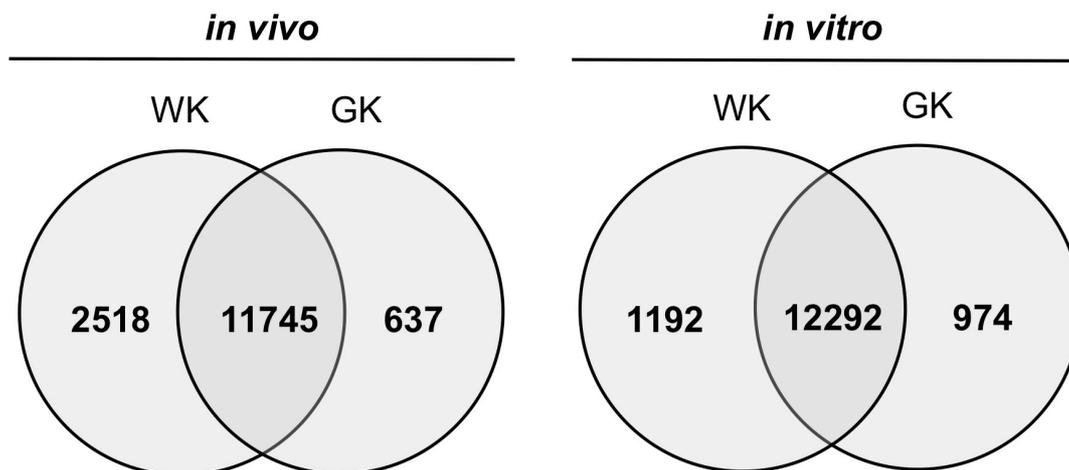


Abb. 3: Allgemeine und spezifische Knorpel-Marker. Die in der Gen-Chip-Hybridisierung sowohl *in vivo* (natives Gewebe) als auch *in vitro* (kultivierte Primärzellen) detektierten Gene konnten in der Auswertung in 3 Gruppen eingeteilt werden: Gene, die in beiden Knorpelgeweben exprimiert werden, also allgemeine Marker von Knorpelzellen (Schnittmenge), Wachstumsfugenknorpel-spezifische Marker (Menge WK) und Gelenkknorpel-spezifische Marker (Menge GK). Angegeben ist jeweils die Anzahl der detektierten Gene.

Die Auswertung erfolgte dann zunächst im Hinblick auf bereits bekannte molekulare Marker des Knorpels. So zeigte sich, dass die Gene *COL2A1* (kodiert die α 1-Kette von Typ II-Kollagen), *ACAN* (kodiert Aggrecan), *DCN* (kodiert Decorin) und *COMP* (kodiert Cartilage oligomeric matrix protein) sowohl im Wachstumsfugen- als auch im Gelenkknorpel exprimiert wurden. Die Expression dieser Gene zeigte sich nicht nur *in vivo* (natives Gewebe), sondern auch *in vitro* (kultivierte Primärzellen) (Abb. 4).

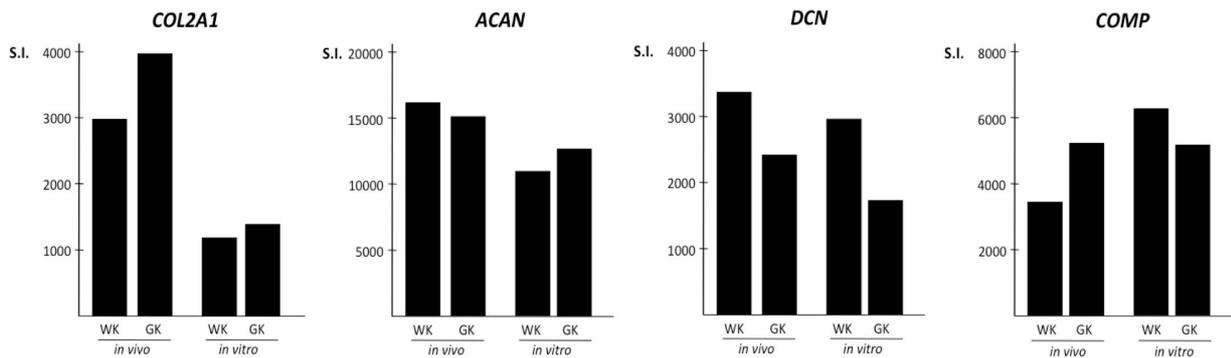


Abb. 4: Allgemeine Knorpelmarker. Dargestellt sind die Affymetrix-Signal-Intensitäten (S.I.) der Genexpression der Wachstumsfugen- und Gelenkknorpel-Chondrozyten *in vivo* und *in vitro*. Die Auswertung der Gen-Chip-Hybridisierung erfolgte zunächst im Hinblick auf allgemeine Marker von Knorpelzellen, wie z.B. *COL2A1*, *ACAN*, *DCN* und *COMP*. Auch an Tag 10 der Differenzierung erhalten die kultivierten Zellen ihren chondralen Phänotyp.

Im Gegensatz dazu zeigten jene Gene, welche bekanntermaßen die Differenzierung und die Funktion hypertropher Chondrozyten regulieren, wie *ALPL* (kodiert die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase), *COL10A1* (kodiert die α 1-Kette von Typ X-Kollagen), *PTH1R* (kodiert den Typ1-PTH/PTHrP-Rezeptor) und *ANGPT1* (kodiert Angiopoietin-1) eine selektive Expression in Wachstumsfugen-Chondrozyten. Dieser molekulare Unterschied zu den Gelenkknorpel-Chondrozyten war auch in den primären Zellkulturen an Tag 10 der Differenzierung nachweisbar (Abb. 5).

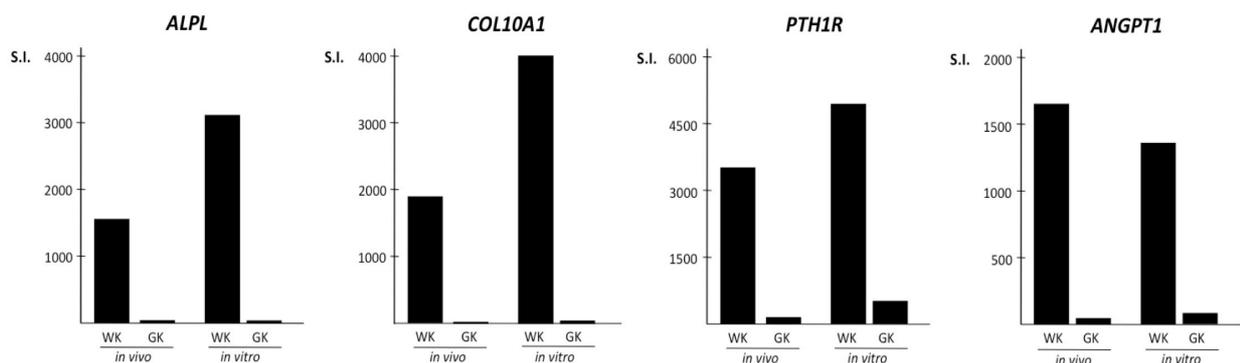


Abb. 5: Wachstumsfugenknorpel-spezifische Marker. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Gen-Chip-Hybridisierung hinsichtlich Wachstumsfugenknorpel-spezifischer Marker, wie z.B. *ALPL*, *COL10A1*, *PTH1R* und *ANGPT1*. Die molekularen Expressionsunterschiede waren auch *in vitro*, in den primären Zellkulturen, nachweisbar. Darüber hinaus konnte dieser molekulare Unterschied in einer auf insgesamt 8 Gewebe erweiterte RT-PCR-Expressionsanalyse bestätigt werden (Abb. 6).

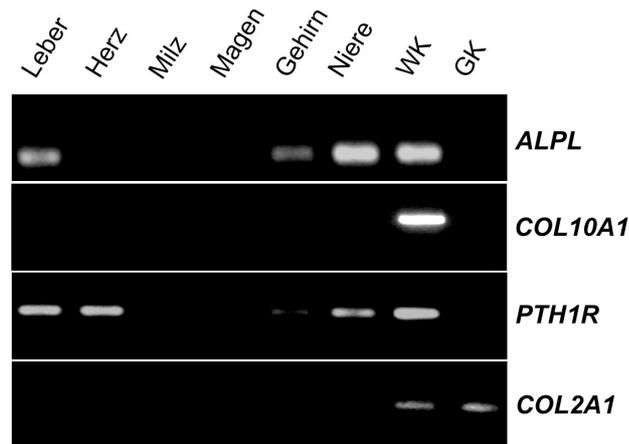


Abb. 6: Gewebe-spezifische Expression von Wachstumsfugenknorpel-Markern. In einer auf 8 Gewebe erweiterte RT-PCR-Expressionsanalyse konnte dieser molekulare Unterschied, im Gegensatz zum allgemeinen Knorpelmarker *COL2A1*, für die Gene *ALPL*, *COL10A1* und *PTH1R* bestätigt werden.

Das wichtigste Ergebnis war hingegen, dass Gene identifiziert werden konnten, wie *ABI3BP* (kodiert ABI Family Member 3 (NESH) Binding Protein), *THBS4* (kodiert Thrombospondin-4) *SIX1* (kodiert den Transkriptionsfaktor Sixe Oculis Homeobox Homolog 1) und *COL14A1* (kodiert α 1- Kette von Kollagen XIV), die *in vivo* und *in vitro* nur in den Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimiert wurden (Abb. 7).

Aus diesen initialen Ergebnissen konnte zum einen geschlussfolgert werden, dass die Affymetrix Gen-Chip-Analyse der geeignete experimentelle Ansatz war und funktionierte, zum anderen konnte gezeigt werden, dass ein zellautonomer, molekularer Unterschied zwischen den Chondrozyten des Gelenk- und des Wachstumsfugenknorpels besteht, welcher auch *ex vivo* unter Zellkulturbedingungen bestehen blieb. Dies spricht für einen intrinsischen Unterschied im Differenzierungsverhalten beider Knorpelzelltypen.

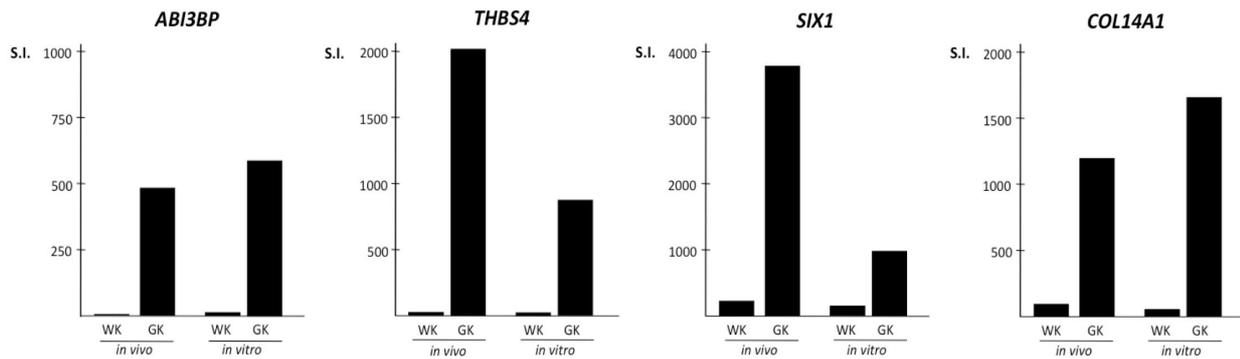


Abb. 7: Gelenkknorpel-spezifische Marker. Das wichtigste Ergebnis war die Identifikation von Genen, wie *ABI3BP*, *THBS4*, *SIX1* und *COL14A1*, die nur in den Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimiert wurden. Auch diese molekularen Unterschiede waren in den primären Zellkulturen nachweisbar, was für einen intrinsischen Unterschied im Differenzierungsverhalten beider Knorpelzelltypen spricht.

3.2 Identifikation spezifischer molekularer Marker des Wachstumsfugen- und des Gelenkknorpels

Durch die Möglichkeit der Sortierung aller auf dem Affymetrix Gen-Chip detektierten Gene nach der Signal Log Ratio (SLR), dem logarithmischen Signalverhältnis der Expression, hinsichtlich des Expressionsunterschieds zwischen den beiden Knorpelgeweben, wurden 34 Marker der Wachstumsfugen- und 19 Marker der Gelenkknorpel-Chondrozyten definiert (Tab. 1, Tab. 2). Das gewählte Einschlusskriterium sah in diesem Zusammenhang vor, dass alle Gene *in vivo* und *in vitro* eine SLR unter -2.0 (höhere Expression in Wachstumsfugenknorpel-Chondrozyten) oder über 2.0 (höhere Expression in Gelenkknorpel-Chondrozyten) aufwiesen und die Affymetrix-Signalintensität in mindestens einem der beiden Knorpelgewebe über 50 betrug.

Dieser Analyseansatz zeigte zunächst, dass der spezifischste Marker hypertropher Chondrozyten, *COL10A1*, das niedrigste SLR aller auf dem Gen-Chip vorhandenen Gene aufwies, was wiederum den Erfolg des gewählten experimentellen Ansatzes bestätigte (Tab. 4). Dieses Ergebnis impliziert, dass auch andere Gene, die eine verstärkte Expression in den Wachstumsfugenknorpel-Chondrozyten aufweisen, von funktioneller Wichtigkeit für ihre Differenzierung und Funktion sein könnten.

Tab. 4: Gene mit verstärkter Expression im Wachstumsfugenknorpel. Dargestellt sind die Affymetrix-Signal-Intensitäten sowie das logarithmische Signalverhältnis (SLR, signal log ratio) für 34 Gene, deren Expression im Wachstumsfugenknorpel sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mindestens 4-fach höher lag (SLR<-2.0) als im Gelenkknorpel.

Gen	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
	WK	GK	SLR	WK	GK	SLR
COL10A1	1114	4	-7.8	2374	26	-6.2
SLC38A4	165	0	-7.7	297	52	-2.7
IBSP	10642	53	-7.5	14033	203	-5.3
LEF1	2407	28	-7.2	1140	178	-2.5
DIO2	2589	16	-6.8	4551	126	-5.3
GPR133	133	2	-6.5	363	20	-4.3
ALPL	1521	24	-6.4	3056	29	-6.7
FLRT3	85	1	-6.2	183	18	-3.0
EFHD1	1523	34	-5.6	2851	182	-4.2
CA2	353	9	-5.2	251	11	-3.8
ANGPT1	1624	48	-5.0	1338	79	-3.9
PTH1R	3430	135	-4.8	4864	503	-3.3
ENPP2	3359	134	-4.6	2954	292	-3.3
A2M	716	11	-4.6	668	40	-4.0
ADAMTS1	578	20	-4.3	678	30	-4.3
BAMBI	602	38	-4.1	1930	402	-2.4
LRRC1	261	11	-4.1	266	40	-2.3
OVOL1	105	5	-4.0	87	6	-2.9
S1PR3	53	3	-3.7	5	10	-2.3
GPR120	285	24	-3.2	716	37	-4.3
REEP1	1096	117	-3.1	786	133	-2.4
VAV3	239	30	-3.0	359	37	-2.2
SPARCL1	696	64	-2.9	2977	409	-2.8
F13A1	6196	1277	-2.9	8127	661	-3.6
WNT5A	132	24	-2.8	176	32	-3.1
CAPNS1	995	117	-2.7	2128	124	-4.1
EPHA3	115	19	-2.7	1178	154	-3.2
TMTC1	590	83	-2.7	559	143	-2.1
SHAS2	1029	156	-2.7	1183	206	-2.1
GRB14	91	12	-2.6	187	9	-3.7
MTSS1	228	39	-2.5	320	40	-2.4
PART1	87	17	-2.4	164	40	-2.0
MAEF2C	799	153	-2.3	1462	265	-2.2
GRIP1	236	43	-2.1	324	41	-2.1

Da das Primärziel dieser Arbeit allerdings in der Identifikation von Genen bestand, die ein umgekehrtes Verhalten aufzeigen, also selektiv in den Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimiert werden, sind die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse als noch relevanter zu betrachten. Das Gen mit der stärksten differentiellen Expression, also dem höchsten SLR, war hier das Gen *ABI3BP*, welches für ein zytoplasmatisches Adapterprotein kodiert, das mit der Induktion von Seneszenz in Verbindung gebracht wird (Hirao et al., 2006; Latini et al., 2008; Terauchi et al., 2006). Ein weiteres differentiell exprimiertes Gen, das von potenzieller Wichtigkeit für

die Differenzierung des Gelenkknorpels sein könnte, war *GDF6*. Es gehört zur Gruppe der BMPs (Bone Morphogenic Proteins) und kodiert einen Wachstumsfaktor, dessen Inaktivierung in der Maus zu Defekten in der Formation des Knorpels und zu Fusionen der Gelenke führt (Settle et al., 2003).

Tab. 5: Gene mit verstärkter Expression im Gelenkknorpel. Dargestellt sind die Affymetrix-Signal-Intensitäten sowie das logarithmische Signalverhältnis für 19 Gene, deren Expression im Gelenkknorpel sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mindestens 4-fach höher lag (SLR>2.0) als im Wachstumsfugenknorpel.

Gen	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
	WK	GK	SLR	WK	GK	SLR
<i>ABI3BP</i>	2	475	7.7	10	579	6.0
<i>THBS4</i>	8	1986	6.9	13	856	4.6
<i>SIX1</i>	223	3717	4.1	139	961	2.8
<i>COL14A1</i>	90	1177	4.0	49	1628	4.7
<i>PPAP2B</i>	433	7803	3.9	201	656	2.0
<i>PTGS1</i>	199	1577	3.0	76	810	3.6
<i>TMEM30B</i>	32	95	2.9	52	137	2.1
<i>ESP8</i>	333	2795	2.9	241	1351	2.0
<i>NOV</i>	23	70	2.8	75	1542	4.4
<i>SHISA3</i>	21	244	2.7	11	179	4.2
<i>GAS1</i>	29	129	2.7	22	709	4.3
<i>GDF6</i>	19	94	2.6	37	123	2.3
<i>GP38K</i>	2983	15448	2.5	81	1193	3.9
<i>GEM</i>	1333	6431	2.4	238	1365	2.5
<i>NF1-B3</i>	215	1109	2.4	113	442	2.0
<i>NFIA</i>	133	572	2.4	118	630	2.7
<i>MMP1</i>	160	806	2.4	29	149	2.1
<i>HIST1H2AC</i>	40	222	2.1	71	459	2.3
<i>MAP2</i>	84	315	2.0	94	453	2.4

Neben dem Ziel, spezifische und potenziell funktionell relevante Gene zu identifizieren, bestand das Hauptanliegen darin, diese Gene als Marker zur Qualitätskontrolle von *in vitro* gezüchtetem Knorpel, dem sog. TE-Knorpel (tissue-engineered Knorpel), zu nutzen. Um diesem Ziel nachzugehen und die Ergebnisse aus der Affymetrix Gen-Chip-Analyse zu bestätigen, wurde zunächst durch eine weiterführende Expressionsanalyse mittels RT-PCR für die Gene mit den höchsten SLR-Werten aus Tabelle 5 ein Gewebe-Expressionsprofil erstellt. Hier konnte nicht nur die erhöhte Expression der zuvor identifizierten Marker im Gelenkknorpel bestätigt werden, sondern auch gezeigt werden, dass die Gene *THBS4* und *SIX1* eine Gelenkknorpel-spezifische Expression aufwiesen. In den mituntersuchten Geweben konnten diese beiden Gene also kaum detektiert werden, was von potenzieller Relevanz für die Chondrozyten des Gelenkknorpels sein könnte (Abb. 8).

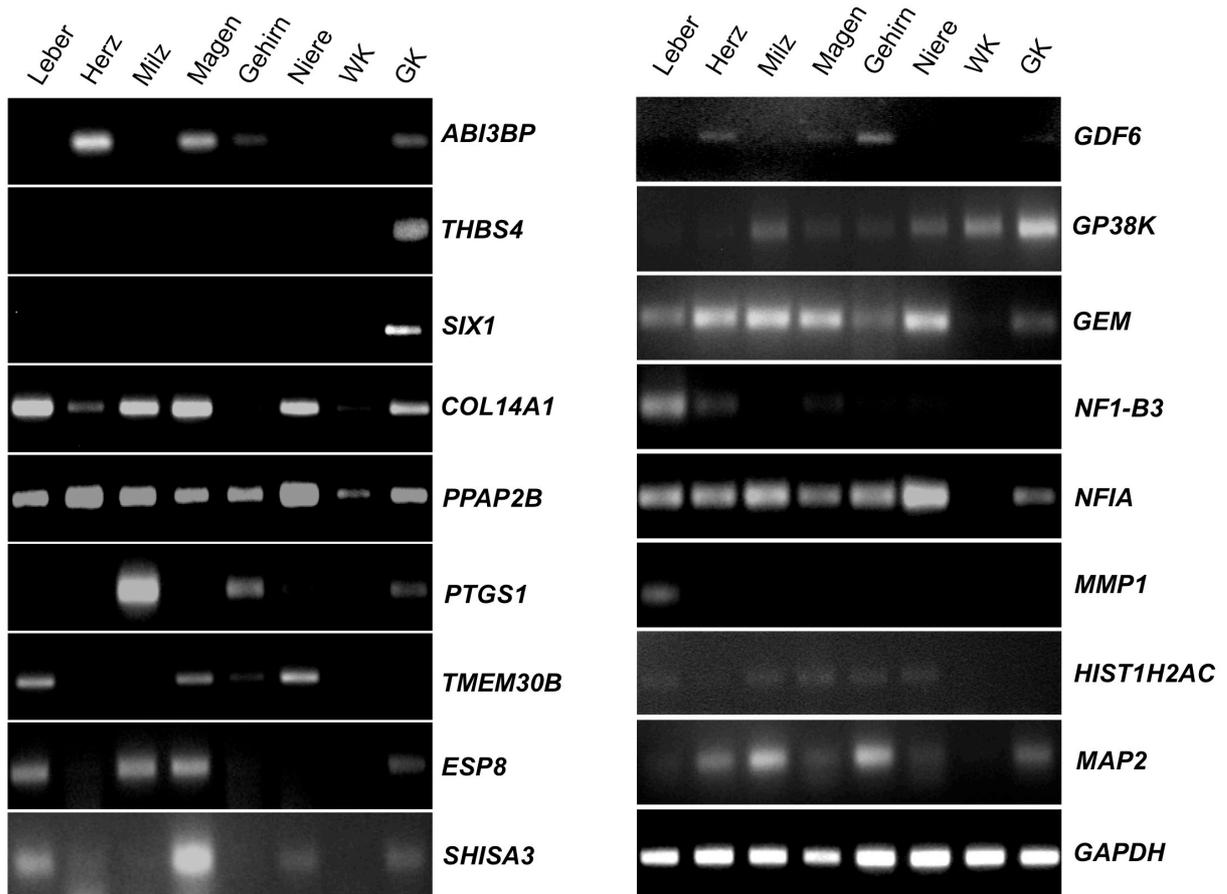


Abb. 8: Gewebe-spezifische Expression von Gelenkknorpel-Markern. Durch erneute RT-PCR-Expressionsanalyse mit 8 verschiedenen Geweben konnte in den meisten Fällen nicht nur die erhöhte Expression der zuvor identifizierten Marker im Gelenkknorpel bestätigt werden, sondern auch gezeigt werden, dass einige dieser Gene (z.B. *THBS4*) eine Gelenkknorpel-spezifische Expression aufwiesen.

Interessanterweise konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass alle anderen Gene der Thrombospondin-Gen-Familie (*THBS1*, *THBS2*, *THBS3* und *THBS5=COMP*) in beiden Knorpelgeweben, also sowohl im Wachstumsfugen- als auch im Gelenkknorpel, exprimiert wurden (Abb. 9).

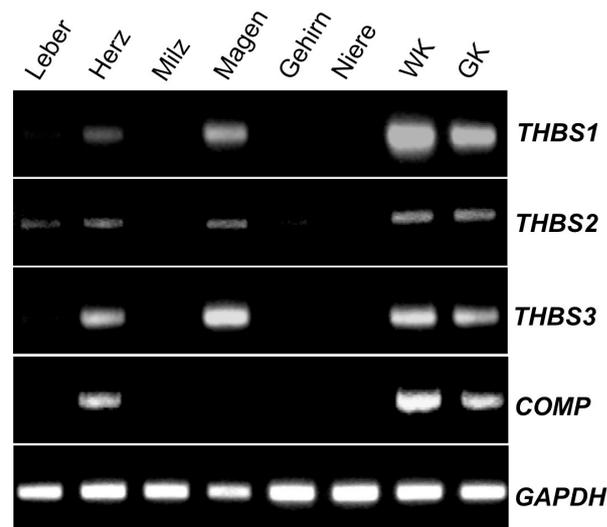


Abb. 9: Gewebe-spezifische Expression der Thrombospondine. Die anderen 4 Mitglieder der *THBS*-Gen-Familie wurden, im Gegensatz zu *THBS4*, sowohl in der Wachstumsfuge, als auch im Gelenkknorpel exprimiert. Daher könnte *THBS4* im Gelenkknorpel funktionell von Bedeutung sein.

3.3 Qualitätskontrolle von *in vitro* gezüchtetem TE-Knorpel

Der *in vitro* gezüchtete TE-Knorpel wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr.-Ing. Pörtner aus dem Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik (Technische Universität Hamburg-Harburg) generiert und uns zur Verfügung gestellt.

Die histologischen Analysen des TE-Knorpels mit und ohne Träger wiesen eine gut geordnete extrazelluläre Matrix auf, in welche Chondrozyten von typischer Morphologie eingebettet waren (Abb. 10). In der Safranin-O-Färbung konnte darüber hinaus der Gehalt von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ein offensichtlicher Unterschied in der Färbungsintensität, wobei die intensivere Matrix-Anfärbung des TE-Knorpels mit Träger auf einen erhöhten Proteoglykan-Gehalt im Vergleich zur trägerlosen Probe schließen lässt (Abb. 10A). Ein ähnlicher Unterschied konnte in der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von Typ II-Kollagen beobachtet werden (Abb. 10B).

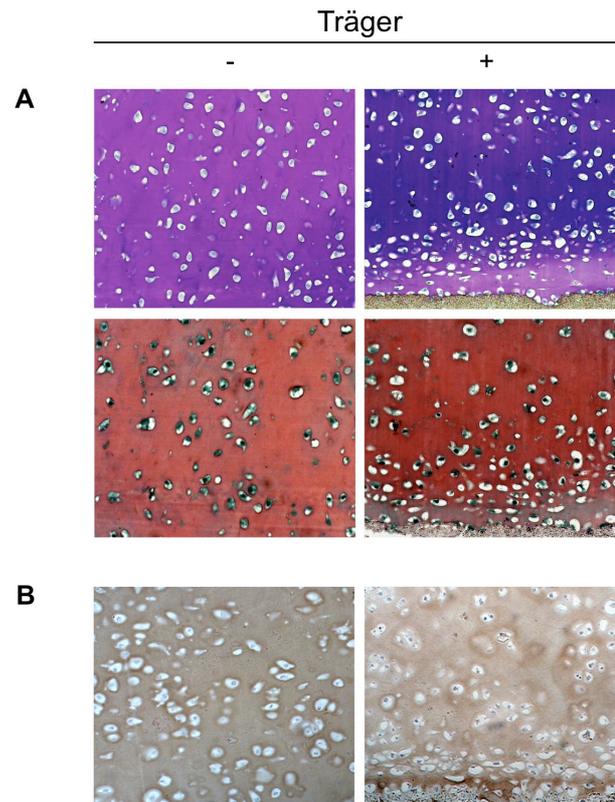


Abb. 10: Histologische Analyse von *in vitro* gezüchtetem Knorpel. (A) Darstellung des TE-Knorpels (TE-Knorpel, tissue-engineered Knorpel) ohne (-) und mit (+) Hydroxylapatit Träger in der Toluidinblau- (oben) und der Safranin-O-Färbung sowie der (B) immunhistochemischen Analyse mit Nutzung eines Antikörpers gegen Typ II-Kollagen.

Die vorangegangenen Expressionsanalysen und die Identifizierung Gelenknorpel-spezifischer Marker ermöglichten es, 5 Proben (3 mit Träger, 2 ohne Träger) des TE-Knorpels hinsichtlich der Expression dieser Marker zu untersuchen. Hiefür wurden wiederum RT-PCR-Expressionsanalysen durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass *COL2A1* in allen untersuchten Proben nachweisbar war, wohingegen typische Marker des Wachstumsfugenknorpels, *COL10A1*, *PTH1R* und *ALPL* nicht detektiert werden konnten (Abb. 11).

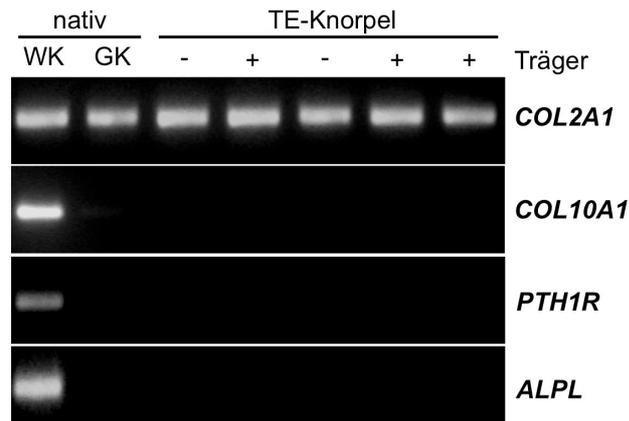


Abb. 11: Molekulare Qualitätskontrolle von *in vitro* gezüchtetem Knorpel. Die Etablierung spezifischer Knorpelmarker wurde zur Qualitätskontrolle des *in vitro* gezüchteten Knorpels (TE-Knorpel, tissue-engineered Knorpel) eingesetzt. Eine RT-PCR-Expressionsanalyse zeigte, dass *COL2A1* in allen untersuchten TE-Knorpel-Proben exprimiert wurde, während typische Marker des Wachstumsfugenknorpels, wie *COL10A1*, *PTH1R* und *ALPL* nicht detektiert werden konnten.

Viel wichtiger war hingegen, dass eine deutliche Expression der zuvor definierten Gelenknorpel-spezifischen Marker in den TE-Knorpel-Proben detektiert werden konnte. Eine starke Expression der Gene *ABI3BP*, *SIX1* und *GDF6* ließ sich in diesem Zusammenhang in denen auf einem Hydroxylapatit-Träger gezüchteten TE-Knorpel-Proben nachweisen, während ihre Expression in den trägerlosen Proben deutlich niedriger war. Eine *THBS4*-Expression konnte nur im nativen Gelenknorpel nachgewiesen werden, nicht hingegen in den untersuchten TE-Knorpel-Proben (Abb. 12). Die fehlende Detektion von *THBS4* demonstriert in diesem Zusammenhang, dass die Zellkulturbedingungen noch verbessert werden können, um eine dem *in vivo* Zustand vergleichbare Situation zu schaffen.

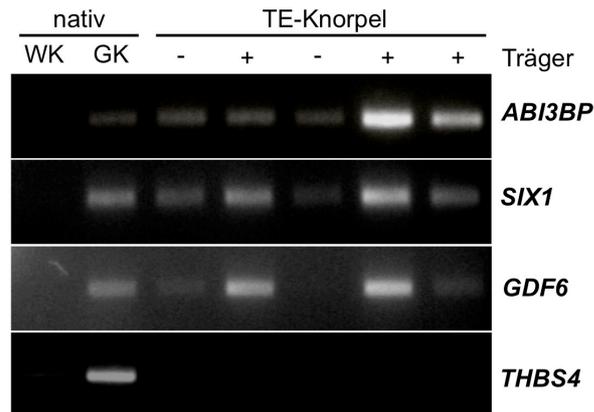


Abb. 12: Molekulare Qualitätskontrolle von *in vitro* gezüchtetem Knorpel. Die Etablierung Gelenknorpel-spezifischer Marker wurde zur Qualitätskontrolle des *in vitro* gezüchteten Knorpels (TE-Knorpel, tissue-engineered Knorpel) eingesetzt. Durch eine RT-PCR-Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Gene *ABI3BP*, *SIX1* und *GDF6* in den TE-Knorpel-Proben exprimiert werden. Darüber hinaus konnte der positive Einfluss eines Hydroxylapatit-Trägers auf die Knorpelqualität auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, wenngleich die Expression von *THBS4* nur im nativen Gelenknorpel nachweisbar war.

4 Diskussion

Defekte des hyalinen Gelenkknorpels gehen oft mit einer schmerzintensiven Arthrose einher und stellen noch immer eine große orthopädische und unfallchirurgische Herausforderung dar. Die derzeit angewandten chirurgischen und zelltherapeutischen Verfahren sind hinsichtlich ihrer Indikationen und ihres Therapieerfolges begrenzt und verbesserungswürdig. Aus diesem Grund ist es von großer klinischer Bedeutung, die molekularen Mechanismen, die Gelenkknorpel-Chondrozyten in ihrer Differenzierung und Funktion regulieren, zu verstehen. (Dell'Accio et al., 2001; Benz et al., 2002; Grogan et al., 2007).

4.1 Optimierung des Tissue Engineerings von Gelenkknorpel

Die Identifikation von Genen, die in den Chondrozyten des Gelenkknorpels, nicht aber in den Wachstumsfugenknorpel-Chondrozyten exprimiert werden, war ein wichtiger erster Schritt, um die regulatorischen, molekularen Mechanismen der Differenzierung und Funktion von Gelenkknorpel-Chondrozyten verstehen zu können. Darüber hinaus zeigte sich dieser molekulare Unterschied zwischen Wachstumsfugen- und Gelenkknorpel auch noch nach 10 Tagen der Chondrozytendifferenzierung *ex vivo*, was für die Generierung von TE-Knorpel eine überaus nützliche Erkenntnis sein könnte. Sehr wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass die Identifikation spezifischer molekularer Marker des Gelenkknorpels zur effizienten Qualitätskontrolle von TE-Knorpel eingesetzt werden kann. Dies ist vor allem deswegen von großer Bedeutung, da die Histologie als Analyse-Instrument in dieser Hinsicht eingeschränkt ist.

Aus diesem Grund ist es eher als eine Stärke als eine Schwäche der vorliegenden Arbeit zu sehen, dass im Gegensatz zu anderen molekularen Markern des Gelenkknorpels keine *THBS4*-Expression in den 5 untersuchten TE-Knorpel-Proben nachgewiesen werden konnte. Dies war für die anderen, von uns zuvor identifizierten, molekularen Marker des Gelenkknorpels allerdings der Fall. Dieses Ergebnis belegt, warum es wichtig ist, Genexpression in TE-Knorpel mit dem nativen Gewebe zu vergleichen, denn die Vermutung, dass zumindest einige der identifizierten Marker auch von funktioneller Relevanz für die Beschaffenheit des

Gewebes sein könnten, ist gerechtfertigt. Darüber hinaus wird es durch die Kontrolle der spezifischen Genexpression in TE-Knorpel möglich sein, die Zellkulturbedingungen zu optimieren, indem man das Medium mit zusätzlichen Wachstumsfaktoren, wie z.B. *GDF6*, supplementiert.

Zur Herstellung von Knorpel-Träger-Konstrukten im Rahmen des Tissue-Engineering werden die *in vitro* vermehrten Chondrozyten, einschließlich der perizellulären Matrix, durch Hochdichte-Kultur im Bioreaktor in die Form eines Pellets gebracht. Da die Generierung dieses Pellets, aus bisher ungeklärter Ursache, nicht immer gelingt, könnte es durchaus interessant sein, auch in diesen Fällen molekulare Expressionsanalysen des TE-Knorpels durchzuführen. Schließlich könnte die fehlende Expression der identifizierten Marker aufschlussreich hinsichtlich der Kultivierungsoptimierung und damit der Gewebebeschaffenheit des TE-Knorpels sein.

Die in dieser Arbeit identifizierten Gene könnten nicht nur als Markerset zur Qualitätskontrolle und Optimierung von *in vitro* gezüchtetem Knorpelgewebe genutzt werden, sondern auch wichtig für Proliferation, Differenzierung und Funktion der Gelenkknorpel-Chondrozyten sein und somit als potenzielle Ansatzpunkte einer medikamentösen Therapie dienen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die funktionelle Relevanz einzelner Kandidaten-Gene hinsichtlich ihres Einflusses auf die chondrozytäre Differenzierung und die Produktion der extrazellulären Matrix zu analysieren.

Bislang ist nicht klar, welchen Einfluss die Qualität des Gelenkknorpels auf den therapeutischen Erfolg verschiedener Verfahren des Tissue Engineerings, wie z.B. der Autologen Chondrozyten Transplantation oder der osteochondralen Zylindertransplantation hat (Pietschmann et al., 2009). In zukünftigen Experimenten könnte es durchaus sinnvoll sein, systematisch alle identifizierten Marker diesbezüglich zu untersuchen. Aufgrund ihrer Expressionsmuster und ihrer beschriebenen Funktion in der Literatur erscheinen in diesem Zusammenhang die Gene *ABI3BP*, *THBS4*, *SIX1* und *GDF6* besonders interessant zu sein.

4.2 *ABI3BP*

Das Gen *ABI3BP* wurde als Seneszenz-induzierend in thyroiden Zelllinien beschrieben (Latini et al., 2008), zudem wurde eine verminderte *ABI3BP*-Expression

in primären Lungenkrebszellen gezeigt (Terauchi et al., 2006). Seneszenz beschreibt einen vitalen, irreversiblen Zustand der zellulären Teilungsinaktivität, wobei die Zellen nicht in den programmierten Zelltod, die Apoptose, gehen (d'Adda di Fagagna 2008). Da bekannt ist, dass sich die Chondrozyten des Gelenkknorpels, in einem Stadium der Seneszenz befinden, d.h. über einen langen Zeitraum teilungsinaktiv in der Knorpelmatrix verbleiben, könnte *ABI3BP* auch im Gelenkknorpel als ein Seneszenz-induzierender Faktor fungieren. Seneszenz wird in der Literatur zwar mit der Entstehung von Arthrose in Verbindung gebracht, doch trotz aufwendiger experimenteller Arbeiten konnte bislang kein spezifischer Mechanismus zur Seneszenz-Induktion in artikulären Chondrozyten bzw. kein hiermit assoziiertes Gen aufgezeigt werden (Martin et al., 2003; Price et al., 2002). Obwohl *ABI3BP* somit für die Pathophysiologie des Gelenkknorpels von Bedeutung sein könnte, ist es eher unwahrscheinlich, dass eine solche potenzielle Rolle schließlich in der Entwicklung eines Therapeutikums münden wird, das die Regenerationsfähigkeit artikulärer Chondrozyten stimuliert. Schließlich wird es einerseits auch in vielen anderen Geweben exprimiert und ist andererseits intrazellulär lokalisiert.

4.3 *SIX1*

Das gleiche gilt für das Gen *SIX1*, das einen Transkriptionsfaktor kodiert und somit im Zellkern lokalisiert ist (Oliver et al., 1995). Es ist bekannt, dass *SIX1* neben der Regulation der Chondrogenese andere Funktionen übernimmt. So führen Mutationen in *SIX1* zum sog. Branchio-oto-renalen Syndrom (BOR), das durch Anomalien der Kiemenbögen und der Niere sowie durch Taubheit und nadelstichartige Vertiefungen im Bereich der Ohrmuschel gekennzeichnet ist (Ruf et al., 2004; Ou et al., 2008). Dementsprechend zeigen *six1*-defiziente Mäuse eine abnormale Entwicklung des Innenohrs, der Nase, des Thymus, der Niere und der Skelettmuskulatur (Ozaki et al., 2004). Pathologien des Gelenkknorpels dieser Mäuse wurden nicht berichtet, da die homozygoten Knockout-Mäuse apnoeisch und somit nicht lebensfähig waren. Da keine Untersuchungen hinsichtlich des Gelenkknorpel-Phänotyps durchgeführt wurden, bleibt unklar, ob die *six1*-defizienten Mäuse mit pathologischen Veränderungen des Gelenkknorpels geboren wurden. Während der murinen und humanen Entwicklung der Gehörbläschen reifen im Innen- und Außenohr Strukturen, die aus elastischem Knorpel bestehen. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit keine

Untersuchungen am elastischen Knorpel durchgeführt, es ist aber durchaus denkbar, dass durch die *six1*-Mutation auch hyaliner Knorpel betroffen sein könnte.

4.4 *GDF6*

Das Gen *GDF6* (Growth Differentiation Factor 6) gehört zur Gruppe der sog. Bone Morphogenic Proteins (BMPs). In der Literatur wird postuliert, dass *GDF6* eine Schlüsselrolle in der Knorpelbildung und Gelenkentwicklung spielen könnte (Settle et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass es in verschiedenen Gelenkanteilen der Vorderläufe der Maus, insbesondere in Ellenbogen- und Handgelenk, exprimiert wird. Die Inaktivierung des Wachstumsfaktors *Gdf6* führt zu strukturellen Defekten der Gelenke, welche die Bänder und vor allem die Formation des Knorpels betreffen. Die kombinierte Inaktivierung von *Gdf6* und *Gdf5*, einem weiteren Wachstumsfaktor aus der Familie der BMPs, resultiert in weiteren schwerwiegenden Schädigungen verschiedener skelettaler Strukturen, wie z.B. der Ausprägung einer Skoliose, einer pathologischen Seitenabweichung und Rotation der Wirbelsäule mit Torsion der Wirbelkörper. Darüber hinaus kommt es in diesen kombinierten Knockout-Mäusen zu Fusionen der Gelenke und Verformung des Knorpels in den Zwischenwirbelgelenken der Wirbelsäule (Settle et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass auch der Wachstumsfaktor *GDF6* für die physiologische Gelenkentwicklung und somit auch für die Differenzierung des Gelenkknorpels von potenzieller Wichtigkeit sein könnte. Der Einsatz dieses Wachstumsfaktors in der Zellkultur lässt einen positiven Einfluss auf die chondrale Differenzierung des TE-Knorpels erhoffen.

4.5 *THBS4*

Besonders vielversprechend erscheint die weitere Analyse der Rolle des extrazellulären Matrix Proteins *THBS4* bezogen auf die Gelenkknorpelfunktion. Tatsächlich wies *THBS4* die höchste Spezifität für Gelenkknorpelexpression in unseren RT-PCR-Untersuchungen auf, was besonders wichtig ist, da die anderen Gene der Thrombospondin-Gen-Familie (*THBS1*, *THBS2*, *THBS3* und *THBS5=COMP*) sowohl im Wachstumsfugen- als auch im Gelenkknorpel exprimiert wurden (Abb. 9). Ferner wurden die anderen Thrombospondine, vor allem *THBS1*, *THBS3* und *THBS5* bereits umfangreich - auch hinsichtlich ihrer Funktion im Knorpel - analysiert (Agah

et al., 2002; Bornstein et al., 2004; Posey et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass variiert kombiniert defiziente *Thbs1-*, *Thbs3-*, *Thbs5-* und *Col9a1-* Mäuse einen abnormalen Phänotyp des Wachstumsfugenknorpels aufweisen: Die Chondrozyten der Wachstumsfugen der Thromospondin/Kollagen 9-defizienten Mäuse verlieren ihre säulenartige Organisation, sodass sich histologisch eine diffuse Anordnung der Zellen in der Matrix darstellte. Darüber hinaus illustrierten die kombinierten Knockout-Mäuse in der Kontaktradiographie deutlich verkürzte Extremitäten. Des Weiteren vermuteten die Autoren eine geringfügig verstärkte, belastungsabhängige Degeneration des Gelenkknorpels der defizienten Mäuse, wobei sie allerdings keinen eindeutigen den Gelenkknorpel betreffenden Effekt zeigen konnten.

Die physiologische Rolle von *THBS4* hingegen, insbesondere seine Funktion im Gelenkknorpel, wurde in der Literatur bisher kaum beschrieben. Aus diesem Grund könnte es in Zukunft durchaus hilfreich sein, den skelettalen Phänotyp *Thbs4*-defizienter Mäuse zu untersuchen, wobei der spezielle Fokus dabei auf die Dicke und die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels gerichtet sein sollte. In diesem Zusammenhang könnte eine Verpaarung *Thbs4*-defizienter Mäuse mit anderen in der Arthrose-Forschung etablierten Mausmodellen, z.B. der *hTNF*-transgenen Maus (*hTNF* = Humaner Tumor Nekrose Faktor), aufschlussreich sein. Da die Überexpression des Gens *hTNF* in der Maus zu einem verstärkten Abbau der Knorpelmatrix, zur Apoptose-Induktion von Chondrozyten und schließlich zur Arthrose-Entstehung führt (Polzer et al., 2007), wäre es durchaus interessant, den Effekt von *hTNF* auf den Gelenkknorpel in *Thbs4*-defizienten Mäuse zu untersuchen.

4.6 Fazit

Auch ohne Berücksichtigung solcher funktioneller Analysen werden in dieser Arbeit neue Optionen zur Qualitätskontrolle von *in vitro* gezüchtetem Knorpel dargelegt. Da die vorliegenden Ergebnisse maßgeblich zur Optimierung von Knorpel-Träger-Konstrukten beitragen und darüber hinaus von Bedeutung für die Identifikation neuer, potenzieller Ansatzpunkte einer medikamentösen Therapie sein könnten, ist ihre zukünftige direkte klinische Relevanz durchaus denkbar.

5 Zusammenfassung

Die Arthrose ist eine Erkrankung des Gelenkes, welche durch die Degeneration aller an der Gelenkbildung beteiligten Strukturen gekennzeichnet ist. Weltweit gibt es etwa 100 Millionen Betroffene, allein in Deutschland liegt die Gesamtprävalenz der Arthrose bei 27,7 % (Helmick et al., 2008; Schneider et al., 2005). Auf dem Boden einer traumatischen Verletzung, eines entzündlichen Prozesses, einer metabolischen oder endokrinologischen Erkrankung kann eine schmerzintensive Arthrose entstehen, die über die zunehmende Deformität schließlich zum Funktionsverlust des Gelenkes führt. Unabhängig ihrer Ursachenvielfältigkeit, haben alle Arthrosen gemeinsam, dass sie mit einem Defekt des Gelenkknorpels einhergehen, dessen Wiederherstellung noch immer eine große orthopädische und unfallchirurgische Herausforderung darstellt. Die zum Gelenkerhalt angewandten chirurgischen und zelltherapeutischen Verfahren sind hinsichtlich ihrer Indikationen und ihres Therapieerfolges begrenzt und verbesserungswürdig, sodass die Arthrose immer wieder im Ersatz des Gelenkes durch eine Endoprothese mündet. Da es außerdem bislang noch keine etablierten medikamentösen Ansatzpunkte zur Behandlung der Arthrose gibt, gilt das Tissue Engineering, d.h. die *in vitro*-Züchtung von Gelenkknorpel, als hoffnungsvoller Therapieansatz der Zukunft.

Um die Qualität dieses *in vitro* gezüchteten Knorpels nicht nur durch histologische und biomechanische Analysen, sondern auch auf Ebene der Gen-Expression zu kontrollieren, sollten in dieser Arbeit spezifische molekulare Marker des Gelenkknorpels identifiziert werden. Hierzu wurde aus Schweinen Gelenk- und Wachstumsfugenknorpel gewonnen, um aus beiden nativen Geweben, aber auch aus den entsprechenden kultivierten Primärzellen, RNA zu isolieren, die für eine Genom-umfassende Affymetrix-Expressionsanalyse eingesetzt wurde.

Die in der Gen-Chip-Analyse detektierten Gene konnten zunächst in 3 Gruppen eingeteilt werden: Allgemeine Marker von Knorpelzellen, Wachstumsfugenknorpel-spezifische Marker und Gelenkknorpel-spezifische Marker. Das entscheidende Ergebnis dieser Arbeit war allerdings, die Identifikation von 19 Genen, die *in vivo* (natives Gewebe) und *in vitro* (kultivierte Primärzellen) nur in den Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimiert wurden. Eine auf 8 Gewebe erweiterte RT-PCR-Expressionsanalyse konnte diesen molekularen Unterschied nicht nur bestätigen,

sondern auch zeigen, dass einige dieser Gene (z.B. *THBS4*) eine Gelenkknorpel-spezifische Expression aufwiesen.

Die Etablierung Gelenkknorpel-spezifischer Marker ermöglichte es schließlich, diese im Rahmen einer interdisziplinären Forschergruppe zur Qualitätskontrolle des *in vitro* gezüchteten Knorpels einzusetzen und diesen mit nativem Knorpelgewebe zu vergleichen.

Es ist denkbar, dass einige der identifizierten Gelenkknorpel-spezifischen Marker für Proliferation, Differenzierung und Funktion der Gelenkknorpelzellen von Bedeutung sein könnten. So könnte der Wachstumsfaktor *GDF6* den Differenzierungsprozess der Gelenkknorpel-Chondrozyten *in vitro* positiv beeinflussen und folglich zur Optimierung des Tissue Engineering von Gelenkknorpel beitragen. Das Seneszenz-induzierende Gen *ABI3BP* könnte eine physiologische Rolle beim Gelenkerhalt spielen und auch *THBS4*, das als einziges Gen der *THBS*-Gen-Familie eine Gelenkknorpel-spezifische Expression aufzeigte, könnte im Gelenkknorpel von funktioneller Relevanz sein.

Aus diesem Grund sollen in Zukunft verschiedene Mausmodelle mit veränderter Expression spezifischer Gelenkknorpel-Marker analysiert werden, um somit auch Ansatzpunkte für eine medikamentöse Therapie zu erhalten.

6 Literaturverzeichnis

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324-9.

Agah, A., Kyriakides, T. R., Lawler, J., & Bornstein, P. (2002). The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-tsp1/tsp2-null mice. *Am J Pathol*, 161(3), 831-9.

Ahmad, N. N., Ala-Kokko, L., Knowlton, R. G., Jimenez, S. A., Weaver, E. J., Maguire, J. I., Tasman, W., & Prockop, D. J. (1991). Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(15), 6624-7.

Ayral, X., Dougados, M., Listrat, V., Bonvarlet, J. P., Simonnet, J., & Amor, B. (1996). Arthroscopic evaluation of chondropathy in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*, 23(4), 698-706.

Ballock, R. T., & O'Keefe, R. J. (2003). The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(4), 715-26.

Bateman, J. F. (2001). The molecular genetics of inherited cartilage disease. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl A, S141-9.

Bellamy, N., Campbell, J., Robinson, V., Gee, T., Bourne, R., & Wells, G. (2006). Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*, (2), CD005328.

Bentley, G., Biant, L. C., Carrington, R. W., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A. M., Skinner, J. A., & Pringle, J., (2003). A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 85(2), 223-30.

Benz, K., Breit, S., Lukoschek, M., Mau, H., & Richter, W. (2002). Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(1), 284-92.

Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 87, 77-95.

Blanco, F. J., Guitian, R., Vázquez-Martul, E., de Toro, F. J., & Galdo, F. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*, 41(2), 284-9.

Bonnet, C. S., & Walsh, D. A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, 44(1), 7-16.

Bornstein, P., Agah, A., & Kyriakides, T. R. (2004). The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1115-25.

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(14), 889-95.

Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47, 477-86.

Bush, P. G., Hall, A. C., & Macnicol, M. F. (2008). New insights into function of the growth plate: Clinical observations, chondrocyte enlargement and a possible role for membrane transporters. *J Bone Joint Surg Br*, 90(12), 1541-7.

Byers, P. H. (2001). Folding defects in fibrillar collagens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1406), 151-7; discussion 157-8.

Cepeda, M. S., Camargo, F., Zea, C., & Valencia, L. (2006). Tramadol for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD005522.

Clegg, D. O., Reda, D. J., Harris, C. L., Klein, M. A., O'Dell, J. R., Hooper, M. M., Bradley, J. D., Bingham, C. O., Weisman, M. H., Jackson, C. G., Lane, N. E., Cush, J. J., Moreland, L. W., Schumacher, H. R., Oddis, C. V., Wolfe, F., Molitor, J. A., Yocum, D. E., Schnitzer, T. J., Furst, D. E., Sawitzke, A. D., Shi, H., Brandt, K. D., Moskowitz, R. W., & Williams, H.J. (2006). Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med*, 354(8), 795-808.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: Cellular senescence as a dna-damage response. *Nat Rev Cancer*, 8(7), 512-22.

Dell'Accio, F., De Bari, C., & Luyten, F. P. (2001). Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum*, 44(7), 1608-19.

Domm, C., Fay, J., Schünke, M., & Kurz, B. (2000). Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur. *Orthopäde*, 29(2), 91-9.

Drenckhahn, D., & Hunziker, E. B. (2003). Knorpelgewebe. *Anatomie, Band 1*, 128-133.

Echtermeyer, F., Bertrand, J., Dreier, R., Meinecke, I., Neugebauer, K., Fuerst, M., Lee, Y. J., Song, Y. W., Herzog, C., Theilmeier, G., & Pap, T. (2009). Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med*, 15(9), 1072-6.

Emmerson, B. C., Görtz, S., Jamali, A. A., Chung, C., Amiel, D., & Bugbee, W. D. (2007). Fresh osteochondral allografting in the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *Am J Sports Med*, 35(6), 907-14.

Fermor, B., Weinberg, J. B., Pisetsky, D. S., Misukonis, M. A., Banes, A. J., & Guilak, F. (2001). The effects of static and intermittent compression on nitric oxide

production in articular cartilage explants. *J Orthop Res*, 19(4), 729-37.

Fidelix, T. S., Soares, B. G., & Trevisani, V. F. (2006). Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, (1), CD005117.

Fitzgerald, J. B., Jin, M., & Grodzinsky, A. J. (2006). Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue. *J Biol Chem*, 281(34), 24095-103.

Glasson, S. S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H. L., Flannery, C. R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., Majumdar, M. K., & Morris, E. A. (2005). Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*, 434(7033), 644-8.

Grande, D. A., Pitman, M. I., Peterson, L., Menche, D., & Klein, M. (1989). The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*, 7(2), 208-18.

Grogan, S. P., Barbero, A., Diaz-Romero, J., Cleton-Jansen, A. M., Soeder, S., Whiteside, R., Hogendoorn, P. C., Farhadi, J., Aigner, T., Martin, I., & Mainil-Varlet, P. (2007). Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum*, 56(2), 586-95.

Hangody, L., & Füles, P. (2003). Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: Ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2, 25-32.

Härle, P., & Fleck, M. (2008). Medikamentöse oder nicht medikamentöse Therapie der Osteoarthrose. *Internist (Berl)*, 49(12), 1458-62.

Hellio Le Graverand-Gastineau, M. P. (2009). OA clinical trials: Current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: What have we learned and where we are headed?. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(11), 1393-401.

Helmick, C. G., Felson, D. T., Lawrence, R. C., Gabriel, S., Hirsch, R., Kwoh, C. K., Liang, M. H., Kremers, H. M., Mayes, M. D., Merkel, P. A., Pillemer, S. R., Reveille, J. D., Stone, J. H., & National Arthritis Data Workgroup (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the united states. Part I. *Arthritis Rheum*, *58*(1), 15-25.

Hirao, N., Sato, S., Gotoh, T., Maruoka, M., Suzuki, J., Matsuda, S., Shishido, T., & Tani, K. (2006). NESH (abi-3) is present in the abi/WAVE complex but does not promote c-abl-mediated phosphorylation. *FEBS Lett*, *580*(27), 6464-70.

Jackson, R. W., & Dieterichs, C. (2003). The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: A 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy*, *19*(1), 13-20.

Kim, H. A., & Blanco, F. J. (2007). Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*, *8*(2), 333-45.

Jay, G. D., Torres, J. R., Warman, M. L., Laderer, M. C., & Breuer, K. S. (2007). The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(15), 6194-9.

Konttinen, Y. T., Mandelin, J., Li, T. F., Salo, J., Lassus, J., Liljeström, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I., & Santavirta, S. (2002). Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, *46*(4), 953-60.

Karaplis, A.C. (2002). Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. *Principles of Bone Biology*, Academic Press, New York, 2002, 33-58.

Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J., & Abramson, S. B. (2008). Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, *16* Suppl 3, S1-3.

Krasnokutsky, S., Samuels, J., & Abramson, S. B. (2007). Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65(3), 222-8.

Kronenberg, H. M. (2006). Pthrp and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1068, 1-13.

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-6.

Latini, F. R., Hemerly, J. P., Oler, G., Riggins, G. J., & Cerutti, J. M. (2008). Re-Expression of abi3-binding protein suppresses thyroid tumor growth by promoting senescence and inhibiting invasion. *Endocr Relat Cancer*, 15(3), 787-99.

Lawrence, R. C., Felson, D. T., Helmick, C. G., Arnold, L. M., Choi, H., Deyo, R. A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M. C., Hunder, G. G., Jordan, J. M., Katz, J. N., Kremers, H. M., Wolfe, F., & National Arthritis Data Workgroup (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the united states. Part II. *Arthritis Rheum*, 58(1), 26-35.

Lee, J. H., Fitzgerald, J. B., Dimicco, M. A., & Grodzinsky, A. J. (2005). Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum*, 52(8), 2386-95.

Loeser, R. F. (2006). Molecular mechanisms of cartilage destruction: Mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum*, 54(5), 1357-60.

Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P., & Roughley, P. J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22(2), 351-84.

Martin, J. A., & Buckwalter, J. A. (2003). The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2, 106-10.

Marcelino, J., Carpten, J. D., Suwairi, W. M., Gutierrez, O. M., Schwartz, S., Robbins, C., Sood, R., Makalowska, I., Baxevanis, A., Johnstone, B., Laxer, R. M., Zemel, L.,

Kim, C. A., Herd, J. K., Ihle, J., Williams, C., Johnson, M., Raman, V., Alonso, L. G., Brunoni, D., Gerstein, A., Papadopoulos, N., Bahabri, S. A., Trent, J. M., & Warman, M. L. (1999). CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nat Genet*, 23(3), 319-22.

Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J. P., Hilal, G., Duval, N., & Martel-Pelletier, J. (2002). Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(6), 491-500.

Matsusue, Y., Yamamuro, T., & Hama, H. (1993). Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*, 9(3), 318-21.

Moldovan, F., Pelletier, J. P., Hambor, J., Cloutier, J. M., & Martel-Pelletier, J. (1997). Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: In vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*, 40(9), 1653-61.

Moseley, J. B., O'Malley, K., Petersen, N. J., Menke, T. J., Brody, B. A., Kuykendall, D. H., Hollingsworth, J. C., Ashton, C. M., & Wray, N. P. (2002). A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 347(2), 81-8.

Nakase, T., Kaneko, M., Tomita, T., Myoui, A., Ariga, K., Sugamoto, K., Uchiyama, Y., Ochi, T., & Yoshikawa, H. (2000). Immunohistochemical detection of cathepsin D, K, and L in the process of endochondral ossification in the human. *Histochem Cell Biol*, 114(1), 21-7.

Niemeyer, P., Pestka, J. M., Kreuz, P. C., Erggelet, C., Schmal, H., Suedkamp, N. P., & Steinwachs, M. (2008). Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med*, 36(11), 2091-9.

Okada, Y., Konomi, H., Yada, T., Kimata, K., & Nagase, H. (1989). Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. *FEBS Lett*, *244*(2), 473-6.

Oliver, G., Wehr, R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Cheyette, B. N., Hartenstein, V., Zipursky, S. L., & Gruss, P. (1995). Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*, *121*(3), 693-705.

Ou, Z., Martin, D. M., Bedoyan, J. K., Cooper, M. L., Chinault, A. C., Stankiewicz, P., & Cheung, S. W. (2008). Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 resulting from a complex chromosomal rearrangement. *Am J Med Genet A*, *146A*(19), 2480-9.

Ozaki, H., Nakamura, K., Funahashi, J., Ikeda, K., Yamada, G., Tokano, H., Okamura, H. O., Kitamura, K., Muto, S., Kotaki, H., Sudo, K., Horai, R., Iwakura, Y. & Kawakami, K. (2004). Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development*, *131*(3), 551-62.

Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., & Abramson, S. B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*, *44*(6), 1237-47.

Pietschmann, M. F., Horng, A., Niethammer, T., Pagenstert, I., Sievers, B., Jansson, V., Glaser, C., & Müller, P. E. (2009). Cell quality affects clinical outcome after MACI procedure for cartilage injury of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, *17*(11), 1305-11.

Polzer, K., Schett, G., & Zwerina, J. (2007). The lonely death: Chondrocyte apoptosis in tnf-induced arthritis. *Autoimmunity*, *40*(4), 333-6.

Posey, K. L., Hankenson, K., Veerisetty, A. C., Bornstein, P., Lawler, J., & Hecht, J. T. (2008). Skeletal abnormalities in mice lacking extracellular matrix proteins, thrombospondin-1, thrombospondin-3, thrombospondin-5, and type IX collagen. *Am J Pathol*, *172*(6), 1664-74.

Price, J. S., Waters, J. G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D. R., Donell, S. T., & Clark, I. M., (2002). The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*, 1(1), 57-65.

Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Benderdour, M., Ranger, P., Bottaro, D. P., & Martel-Pelletier, J. (2001). Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: Involvement of the stress-activated protein kinase/c-jun n-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. *Arthritis Rheum*, 44(1), 73-84.

Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Cloutier, J. M., & Martel-Pelletier, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*, 97(9), 2011-9.

Rintelen, B., Neumann, K., & Leeb, B. F. (2006). A meta-analysis of controlled clinical studies with diacerein in the treatment of osteoarthritis. *Arch Intern Med*, 166(17), 1899-906.

Roach, H. I., Aigner, T., & Kouri, J. B. (2004). Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes?. *Apoptosis*, 9(3), 265-77.

Roberts, S., Hollander, A. P., Caterson, B., Menage, J., & Richardson, J. B. (2001). Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum*, 44(11), 2586-98.

Ruf, R. G., Xu, P. X., Silvius, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T., Kumar, S., Neuhaus, T. J., Kemper, M. J., Raymond, R. M., Brophy, P. D., Berkman, J., Gattas, M., Hyland, V., Ruf, E. M., Schwartz, C., Chang, E. H., Smith, R. J., Stratakis, C. A., Weil, D., Petit, C., & Hildebrandt, F. (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(21), 8090-5.

Schneider, S., Schmitt G., Mau H., Schmitt H., Sabo, D., & Richter W. (2005). Prävalenz und Korrelate der Osteoarthritis in der BRD. Repräsentative Ergebnisse des ersten Bundesgesundheitsurvey. *Orthopäde*, 34, 782–790.

Schumacher, B. L., Hughes, C. E., Kuettner, K. E., Caterson, B., & Aydelotte, M. B. (1999). Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res*, 17(1), 110-20.

Settle, S. H., Rountree, R. B., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K., & Kingsley, D. M. (2003). Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *gdf6* and *gdf5* genes. *Dev Biol*, 254(1), 116-30.

Smith, G. D., Knutsen, G., & Richardson, J. B. (2005). A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br*, 87(4), 445-9.

Stanton, H., Rogerson, F. M., East, C. J., Golub, S. B., Lawlor, K. E., Meeker, C. T., Little, C. B., Last, K., Farmer, P. J., Campbell, I. K., Fourie, A. M., & Fosang, A. J. (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*, 434(7033), 648-52.

Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J., & Rodkey, W. G. (2003). Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 19(5), 477-84.

Terauchi, K., Shimada, J., Uekawa, N., Yaoi, T., Maruyama, M., & Fushiki, S. (2006). Cancer-Associated loss of TARSH gene expression in human primary lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(1), 28-34.

Towheed, T. E., Maxwell, L., Judd, M. G., Catton, M., Hochberg, M. C., & Wells, G. (2006). Acetaminophen for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, (1), CD004257.

Wagner H. (1964). Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop*, 98, 333-335.

Willauschus, W., Herrmann, J., Wirtz, P., & Weseloh, G. (1995). Die Früherfassung der Arthrose aus klinischer Sicht. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 133(6), 507-13.

7 Danksagung

Es sind viele Menschen, die mich auf dem Weg zur Erstellung dieser Arbeit in ganz unterschiedlicher Weise unterstützt und motiviert haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling, für die Überlassung des Themas danken und auch dafür, dass er immer ein offenes Ohr hatte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Thorsten Schinke, möchte ich ganz besonders danken. Er hat mich in meiner täglichen Arbeit angeleitet, sich immer wieder Zeit zur Besprechung des Aktuellen genommen und mir Gradlinig- und Genauigkeit des Vortragens beigebracht.

Ich danke auch Frau Dr. rer. nat. Anke Baranowsky und Herrn Dr. med. Jan Malte Pestka für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe in vielen organisatorischen Angelegenheiten.

An dieser Stelle seien auch Herr Jochen Schulze und Herr Joachim Albers genannt, die mich in die Methodik des experimentellen, wissenschaftlichen Arbeitens eingearbeitet haben und diesbezüglich stets sehr hilfsbereit waren.

Bei Herrn Dr. med. Frank Timo Beil möchte ich mich nicht nur für freundschaftliche, konstruktive Gespräche, sondern auch für die gute Zusammenarbeit an verschiedenen Projekten bedanken. Herrn Dr. med. Florian Barvencik gilt in diesem Zusammenhang ebenfalls mein Dank.

Herrn PD Dr.-Ing. Pörtner und seiner Arbeitsgruppe aus dem Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg sowie Herrn Dr. Streichert aus dem Institut der Klinischen Chemie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) möchte ich für die ausgesprochen gute Kooperation danken.

Herrn Dr. med. Christoph von Domarus, Herrn Dr. med. Philip Catalá-Lehnen, Herrn Dr. ing. Michael Hahn, Herrn Robert Percy Marshall, Herrn Dr. rer. medic. Björn Busse, Frau Regina Deiwick, Frau Olga Winter und Frau Marion Dietzmann danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung des Projektes.

Meiner Familie und meiner Freundin Clarissa gilt ein ganz besonderer Dank für unbedingte Unterstützung und Rückhalt.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 18. November 1982 in Hamburg
Staatsbürgerschaft deutsch
Eltern: Regina Müller-Scheven
Dr. med. Klaus-Georg Hißnauer

Schulbildung und Zivildienst

1993 - 2002 Walddörfer Gymnasium (WDG) in Hamburg / Volksdorf
Abschluss: Hochschulreife
1999 Lakefield College School in Ontario / Kanada
2002 - 2003 Verein für Altenhilfe in Hamburg / Volksdorf

Studium

Seit 2003 - 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Herbst 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006 - 2007 Einjähriges Auslandsstudium an der Universität Palermo, Italien
Auslandsfamulatur in der Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Rom, Italien
2009 - 2010 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Orthopädie
1.1. Schön Klinik Hamburg Eilbek, Prof. Dr. med. Hille
1.2. Jefferson Medical College, Philadelphia, PA USA
Todd J. Albert, MD Professor
2. Tertial: Chirurgie
2.1. Unfallchirurgie, UKE, Prof. Dr. med. Rueger
2.2. Universitätsspital Zürich, CH, Prof. Dr. med. Clavien
3. Tertial: Innere Medizin
3.1. I.Med. Klinik, Gastroenterologie, UKE, Prof. Dr. med. Lohse
3.2. Universitäres Herzzentrum, UKE, Prof. Dr. med. Meinertz
Herbst 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Fremdsprachen

Englisch, fließend in Wort und Schrift
Italienisch, fließend in Wort und Schrift
Spanisch, Grundkenntnisse

9 Anhang: Publikation

Hissnauer, T. N., Baranowsky, A., Pestka, J. M., Streichert, T., Wiegandt, K., Goepfert, C., Beil, F. T., Albers, J., Schulze, J., Ueblacker, P., Petersen, J. P., Schinke, T., Meenen, N. M., Pörtner, R., & Amling, M. (2010). Identification of molecular markers for articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. [Epub ahead of print]

Osteoarthritis and Cartilage



Identification of molecular markers for articular cartilage

T.N. Hissnauer ^{†a}, A. Baranowsky ^{†a}, J.M. Pestka ^{†a}, T. Streichert [‡], K. Wiegandt [§], C. Goepfert [§], F.T. Beil [‡], J. Albers [‡], J. Schulze [‡], P. Ueblacker ^{‡||}, J.P. Petersen [¶], T. Schinke [‡], N.M. Meenen [#], R. Pörtner [§], M. Amling ^{†*}

[†] Department for Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[‡] Department of Clinical Chemistry/Central Laboratories, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[§] Institute of Bioprocess and Biosystems Engineering, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

^{||} MW Centre for Orthopaedics and Sports Medicine, Munich, Germany

[¶] Department of Trauma-, Hand- and Reconstructive Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

[#] Pediatric Sports Medicine, Altona Children's Hospital, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2010

Accepted 4 October 2010

Keywords:

Osteoarthritis

Cartilage

Tissue engineered

Molecular markers

SUMMARY

Objective: The aim of the current study was to identify molecular markers for articular cartilage (AC) that can be used as tools for the quality control of tissue engineered (TE) cartilage.

Design: A genome-wide expression analysis was performed using RNA isolated from articular and growth plate (GP) cartilage, both extracted from the knee joints of 6 weeks old minipigs. After confirming the specific expression for selected genes by RT-PCR, these were used as molecular markers for the quality control of TE cartilage.

Results: Albeit several known chondrocyte markers were expressed to a similar extent in articular and GP cartilage, our genome-wide expression analysis led us to identify genes being selectively expressed in either GP or articular chondrocytes. These findings led us to perform a RT-PCR expression analysis for the corresponding genes to demonstrate the absence of GP-specific markers in TE cartilage, while common or AC markers were expressed.

Conclusions: Taken together, these results provide important novel insights into chondrocyte biology in general and AC in particular. In addition, it is reasonable to speculate, that some of the identified genes play distinct roles in the regulation of articular chondrocyte differentiation and/or function, thereby raising the possibility that they may serve as targets for non-operative therapies of osteoarthritis (OA).

© 2010 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is one of the most common predictors of health, affecting more than 100 million individuals worldwide¹. The major problem in the treatment of OA is that articular cartilage (AC) defects heal very poorly, which is a consequence of a low regenerative capacity of articular chondrocytes. This explains why surgical interventions often become inevitable since no existing medication substantially promotes the healing process².

One tissue engineering approach of hallmark clinical importance is the implantation of autologous chondrocytes (ACI)³. ACI

has become a well-established and accepted surgical procedure for the treatment of cartilage defects of the knee joint^{4,5}. However, the implantation of ACI is associated with typical complications⁶, and in numerous cases *in vitro*-expanded and *in vivo*-implanted chondrocytes stimulate the formation of fibrocartilagenous replacement tissue instead of durable hyaline cartilage⁷. One possible explanation for these complications lies in the paucity of knowledge concerning the molecular regulation of articular chondrocyte differentiation and function. In fact, although it is commonly accepted that there are functional differences between growth plate (GP) and articular chondrocytes, the quality of tissue engineered (TE) cartilage is mostly controlled through the determination of glycosaminoglycan (GAG) content or type-II-collagen production, and not by an expression analysis for specific molecular markers.

A second and very promising surgical intervention for the repair of AC defects is the implantation of autologous osteochondral cylinders. This technique has been shown to provide superior

* Address correspondence and reprint requests to: Michael Amling, Department for Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel: 49-40-741056373.

E-mail address: amling@uke.uni-hamburg.de (M. Amling).

^a These authors contributed equally to this work.

results in humans, but is associated with donor side morbidity^{8–10}. Therefore, TE osteochondral implants appear to be highly promising alternatives and have shown to provide good results in animal models¹¹ and humans⁸. The requirements and components for “lifelike” TE-cartilage are still elusive and up to this day sufficient chondrocyte-specific markers associated with successful engineering of *in vitro*-cartilage have not been established.

Thus, the aim of our study was to perform a genome-wide expression analysis comparing GP and articular chondrocytes, both *in vivo* and *in vitro*, which led us to identify a set of genes being specifically expressed in AC. Since these genes could not only serve as molecular markers for the quality control of cartilage implants, but also be of functional relevance for the regulation of articular chondrocyte activities, we believe that our results may help to optimize the therapeutical concepts for the treatment of AC lesions.

Materials and methods

Isolation of GP and articular chondrocytes

Bone-cartilage cylinders with an average length of 3 cm and diameter of 0.5 cm were harvested from the medial and lateral condyle of knee joints of 6 weeks old minipigs by using an electric punch. Bone-cartilage cylinders were separated in articular and GP cartilage and bone under the dissecting microscope with the help of a scalpel and a forceps. Primary chondrocytes were isolated from articular and GP cartilage by using collagenase type Ia (Sigma–Aldrich, Germany) solution. Therefore cartilage was digested in 0.2% (w/v) collagenase in DMEM/Hams’F12 (PAA, Germany) for 4–5 h at 37°C on a shaker and cultivated with DMEM/Ham’F12 supplemented with 10% (v/v) FBS (Lonza, Germany), 100 µg/mL Sodium pyruvate (Sigma–Aldrich, Germany), 100 U/mL penicillin (Invitrogen, Germany), 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Germany). Chondrocytes were seeded in high density for monolayer (2×10^6 cells/6-well-plate) and cultured at 37°C under an atmosphere of 5% (v/v) O₂ and 5% (v/v) CO₂.

Histology of biopsies

For non-decalcified histology bone-cartilage cylinders were fixed in formaldehyde (4% (v/v) in PBS). After dehydrating and embedding in methylmethacrylate, sections of 4 µm were cut in the sagittal plane on a Microtec rotation microtome (Techno-Med, Germany). For Safranin-O staining sections were dehydrated, stained in Safranin-O (3% (v/v) aqua dest.), afterwards washed in acetic acid (1% (v/v) in aqua dest.) and submerged in Fast Green solution (0.2% (w/v) in aqua dest.).

Expression analysis

Total RNA was extracted from articular and GP cartilage of bone-cartilage cylinders and cultured chondrocytes using the TRIzol® reagent (Invitrogen, Germany) followed by further purification using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer’s instructions. RNA was also isolated from various tissues of 6 weeks old minipigs, as well as from TE-cartilage. For microarray expression analysis Affymetrix porcine U74v2 Gene Chips containing 24,000 genes and expressed sequence tags (ESTs) were used. The targets for Affymetrix DNA microarray analysis were prepared as described by the manufacturer. The amount of total RNA used for the cDNA synthesis was 15 µg for each reaction. Gene Chip microarrays were hybridized with the targets for 16 h at 45°C, washed and stained using the Affymetrix Fluidics Station according to the Gene Chip Expression Analysis Technical Manual. Microarrays

Table 1
Primers used for RT-PCR expression analysis

COL2A1	Forward-Primer: 5'-GGCCTCCCCGGAATC-3' Reverse-Primer: 5'-CCTCTCCGCGTCTTTC-3'
COMP	Forward-Primer: 5'-GGATGCCTGTGACAACCTGTC-3' Reverse-Primer: 5'-AAGGCCCTGAAGTCGGTGAG-3'
COL10A1	Forward-Primer: 5'-GCTCCCATCCCTTTGATAAGA-3' Reverse-Primer: 5'-AGCCTGATCCAGGTAGCCCTTTG-3'
ALPL	Forward-Primer: 5'-TTCAGAGGAGCTGCGATGT-3' Reverse-Primer: 5'-TGTCCCCAAGCTCAGTCTAAC-3'
PTH1R	Forward-Primer: 5'-AAGTCCAGTGCCAAATGCCAG-3' Reverse-Primer: 5'-CTTTGGCGTCCATTACATCGT-3'
ABI3BP	Forward-Primer: 5'-CCATCTGGACTGAAAGACCCCTT-3' Reverse-Primer: 5'-CCACAACTGGCAGTGATCTTC-3'
THBS4	Forward-Primer: 5'-ATCCAGGCGATGAAATTTCTG-3' Reverse-Primer: 5'-AGGTGTCCTATCGCTGGTTCCT-3'
SIX1	Forward-Primer: 5'-CCAGCGTCCGGTCAAATTTAGT-3' Reverse-Primer: 5'-CCAGGTGCGCAGATTGTAC-3'
COL14A1	Forward-Primer: 5'-GTGGTTAAGGAGGACAAGCCCT-3' Reverse-Primer: 5'-TGCTGTGTATCCCTAGCTCCG-3'
PPA2B	Forward-Primer: 5'-TGTGGTTACAGGTAGCCCTTT-3' Reverse-Primer: 5'-GGCAGTCTTGTAGGTTCTGC-3'
PTGS1	Forward-Primer: 5'-TGGAAGGCCACAGAAATTC-3' Reverse-Primer: 5'-GGTGGTCTTGTGTGTTC -3'
ESP8	Forward-Primer: 5'-CCTGCCTCAATCAAGATCAA-3' Reverse-Primer: 5'-GAAATGTACCGTGTCCACTTGC-3'
SHISA3	Forward-Primer: 5'-CGTTAACCACTGACCACGACG-3' Reverse-Primer: 5'-GAAATGTACCGTGTCCACTTGC-3'
GDF6	Forward-Primer: 5'-TTACTCCATCGCTGAGAAGCTG-3' Reverse-Primer: 5'-TGTGGGAGAGATCGCTGGTTC-3'
GP38K	Forward-Primer: 5'-ACCGGCACCATGTAAGACATG-3' Reverse-Primer: 5'-CAAGTCAGGCTTTGACAGGAT-3'
GEM	Forward-Primer: 5'-GAGCGTGGTGTGTTCCACAT-3' Reverse-Primer: 5'-GGC AAT CCT AGC TCC ACG AAT-3'
NFIA	Forward-Primer: 5'-ACCAGTCAAAAAACCTGTGGA-3' Reverse-Primer: 5'-TGTTGTGAAACGAAACCC-3'
MAP2	Forward-Primer: 5'-ATTCCAAGGTTCACCAATGCC-3' Reverse-Primer: 5'-CCAGCCATTGAAGAATGCCT-3'
TMEM30B	Forward-Primer: 5'-GCGCGCATCCGCGAGGCCAA-3' Reverse-Primer: 5'-AGACGACCAGCATGACAAG-3'
NF1-B3	Forward-Primer: 5'-TATTCTTCTCCAGCCCATC-3' Reverse-Primer: 5'-TGGACATTTGCCGTTAGGA-3'
MMP1	Forward-Primer: 5'-ACCCCAAGGACATCCACAGAT-3' Reverse-Primer: 5'-CAACTTGTGTGCAATCCAG-3'
HIST1H2AC	Forward-Primer: 5'-TTTCAGAGCCCCACTATTTC-3' Reverse-Primer: 5'-CAGGTGCAGGATCAGTCAATGA-3'
OSX	Forward-Primer: 5'-CGACTGCCCAACTGCCAGG-3' Reverse-Primer: 5'-TGCCGTACACCTTGCCCG-3'
RUNX2	Forward-Primer: 5'-TGCTCATCCCTGCCTGTGT-3' Reverse-Primer: 5'-TGTGGGGTGCTCAGGAGGG-3'
GAPDH	Forward-Primer: 5'-CTTCGTCAAGCTCATCTTCG-3' Reverse-Primer: 5'-AGTCAGGAGATGCTCGGTGTG-3'

were scanned with the Affymetrix Gene Chip Scanner 7G and the signals were processed using the Gene Chip expression analysis algorithm (Affymetrix, USA). To compare samples and experiments, the trimmed mean signal of each array was scaled to a target intensity of 100. Absolute and comparison analyses were performed with Affymetrix MAS 5.0 and GCOS 1.4 software using default parameters. Annotations were further analyzed with interactive query analysis at www.affymetrix.com. All expression data have been submitted to the GEO archive (accession number: GSE23492).

To independently confirm the hybridization data, we performed RT-PCR expression analysis using samples from two different animals. Therefore the isolated RNA from native material and cultured chondrocytes was reverse transcribed using the Cloned AMV First-Strand cDNA synthesis Kit (Invitrogen, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The resulting cDNA was used for a PCR reaction with gene-specific primers (Table 1). The PCR products were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Quantitative RT-PCR analysis was performed using a StepOne-Plus system, predesigned TaqMan gene expression assays, and

TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems, USA) for expression of *ACAN*, *COL2A1*, *COL10A1*, and *GAPDH* as an internal control. *THBS4* expression was analyzed by Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). The standard curve profiles of *THBS4* and *GAPDH* (internal control) were generated by the Step OnePlus software. Relative quantification was performed according to the $\Delta\Delta C_T$ method, and results were expressed in the linear form using the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ for both RT-PCR assays.

Generation of TE-cartilage

Chondrocytes were isolated from the knee joint (femur) of a 5-month-old domestic pig by using hyaluronidase type-III solution (Sigma–Aldrich, Germany), trypsin (Roth, Germany) and collagenase type Ia solution (Sigma–Aldrich, Germany).

Cartilage-carrier-constructs were generated according to a concept described previously^{12,13}. Therefore isolated chondrocytes were expanded until passage 3. Proliferation of the cells was performed in DMEM (PAA, Germany) supplemented with 10% (v/v) FBS (PAA, Germany), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (PAA, Germany), 25 mM HEPES (Roth, Germany) and 10 ng/mL rhFGF-b (CellConcepts, Germany)¹⁴. Chondrocytes were then trypsinated and sedimented onto a solid calcium phosphate carrier (Sponceram HA®, Zellwerk, Germany) to form a cell layer. To initiate cell proliferation within 2 weeks of cultivation, the medium mentioned above was used. Simultaneously, chondrocytes from the same preculture were immobilized in alginate beads for 2 weeks for re-differentiation and production of cartilage matrix.

After recovering cells from the gel, cartilage constructs were prepared. Re-differentiated cells were centrifuged onto each cell coated carrier, located in a special device¹². For the preparation of cartilage constructs without using any carrier, cells harvested from alginate culture were centrifuged in a tube. After 2 days constructs (same procedure for both methods) were transferred to 12-well-plates and cultivated for 3 weeks altogether in a high-density cell culture.

During cultivation of alginate beads and cartilage-carrier-constructs, DMEM supplemented with 10% (v/v) porcine serum (PS, Gibco, Germany), penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, PAA, Germany), 25 mM HEPES, 0.28 mM L-ascorbic acid 2-phosphate and 1 mM cysteine (Sigma–Aldrich, Germany) was used. Furthermore, during re-differentiation in alginate gel 100 ng/mL rhIGF-I (CellConcepts, Germany) and 10 ng/mL rhTGF-β1 (CellConcepts, Germany) were added to the medium¹⁵. All cultivations were performed at 37°C under an atmosphere of 5% (v/v) O₂ and 5% (v/v) CO₂.

Histological analysis of TE-cartilage

For histological analysis of TE-cartilage samples were fixed in formaldehyde (4% (v/v) in PBS), dehydrated and embedded in methylmethacrylate (Merck, Germany). Sections of 4 µm thickness were cut in the sagittal plane on a Microtec rotation microtome (Techno-Med, Germany) and stained by Toluidine blue (1% (w/v) in aqua dest.) and Safranin-O. Immunohistochemistry was performed on decalcified sections using a monoclonal antibody against human type-II-collagen (1:100, Acris, Germany). A biotinylated secondary antibody against mouse-IgG (Dako, Denmark) was used, followed by a streptavidin (Dako, Denmark) and horseradish peroxidase (Dako, Denmark). Peroxidase activity was detected using diaminobenzidine (Dako, Denmark) as chromogenic substrate.

Biochemical analysis and biomechanical parameters of TE-cartilage

To quantify biochemical properties of cartilage constructs, GAG content was determined according to Buschmann *et al.*¹⁵. The

generated tissue was digested with papain solution (Roche, Germany). The GAG content was then measured photometrically by staining with 1,9-dimethylmethylene blue chloride (Serva, Germany). For measuring the height and the Young's Modulus, a high-precision material testing equipment (Zwicki 1120, Zwick, Germany) was used. The Young's Modulus was determined by stepwise stress-relaxation tests according to Korhonen *et al.*¹⁶. The criterion for relaxation was a relaxation rate less than 0.002 N/min. The Young's Modulus was calculated from resulting stress–strain curve. Results are shown as means and error bars represent 95% confidence interval. For statistical analysis (Student's *t*-Test) the software NCSS 97 was used.

Results

Isolation and molecular profiling of GP and articular chondrocytes

The histological analysis of the harvested bone-cartilage cylinders using Safranin-O staining showed intact articular and GP cartilage, separated by epiphyseal bone [Fig. 1(A)]. Since this allowed a clear discrimination between both types of cartilage, we were not only able to isolate RNA from the corresponding native tissues, but also to isolate articular and GP chondrocytes. These were then cultured for 10 and 20 days, before we isolated RNA that was used for Affymetrix Gene Chip hybridization, together with the RNA from the native tissues. This allowed the simultaneous quantification of mRNA expression for approximately 20.000 genes in both types of cartilage, both *in vivo* (native tissues) and *in vitro* (cultured cells).

Using this approach we first observed that common chondrocyte markers, such as *COL2A1* (encoding α1-type-II-collagen), *ACAN* (encoding Aggrecan) and *COMP* (encoding Cartilage oligomeric matrix protein) were expressed at similar levels in articular and GP cartilage, both *in vivo* and *in vitro* [Fig. 1(B)]. In contrast, genes, which are known to regulate differentiation and function of hypertrophic chondrocytes, such as *ALPL* (encoding Tissue-nonspecific alkaline phosphatase), *COL10A1* (encoding α1-type-X-collagen) and *PTH1R* (encoding the PTH/PTHrP receptor) were selectively expressed in GP chondrocytes and this molecular difference to articular chondrocytes was still present after 10 days of *in vitro* culture [Fig. 1(C)]. Most importantly however, we were also able to identify genes, such as *ABI3BP* (encoding a Abl interactor family member), *THBS4* (encoding Thrombospondin-4) and *SIX1* (encoding a sine-oculis-related homeobox transcription factor) that were only expressed in articular chondrocytes, both *in vivo* and *in vitro* [Fig. 1(D)]. Taken together, these initial data did not only demonstrate the success of the chosen approach, but also provided evidence for a cell-autonomous molecular difference between GP and articular chondrocytes that persists under tissue culture conditions.

Identification of specific GP and AC markers

Since it is possible to sort all genes present on the Gene Chips according to their signal log ratios (SLR) of differential expression between articular and GP chondrocytes, we went on to define 34 markers of GP chondrocytes and 19 markers of articular chondrocytes, which are listed in Tables II and III, respectively. The chosen inclusion criteria were that all of these genes displayed a SLR below –2.0 (higher expression in GP chondrocytes) or above 2.0 (higher expression in articular chondrocytes), both *in vivo* and *in vitro* (day 10 of differentiation), and that the Affymetrix signal intensity was higher than 50 at least in one type of cartilage.

Most importantly, this type of analysis revealed that the most specific marker of hypertrophic chondrocytes, *COL10A1*, displayed

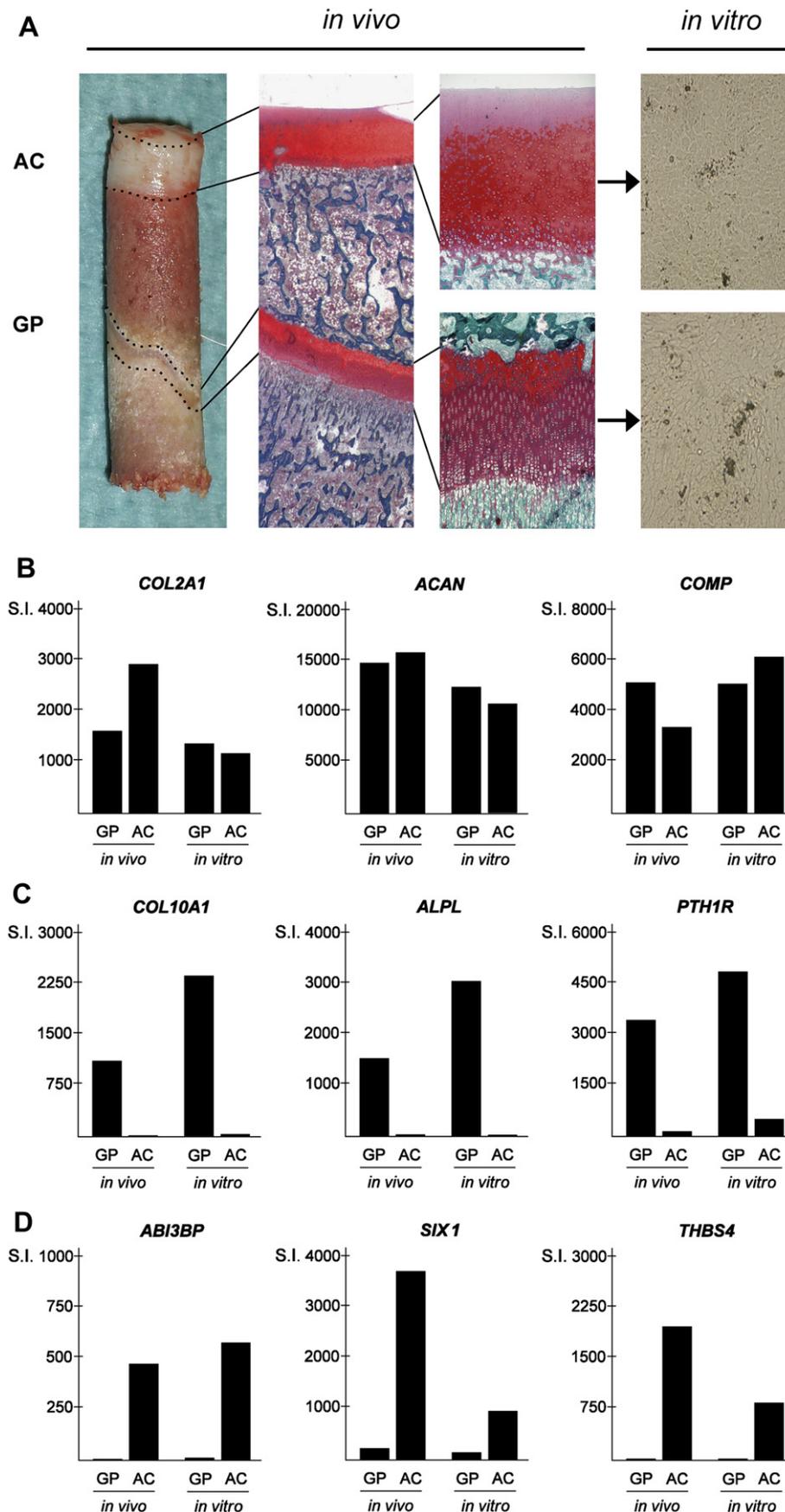


Fig. 1. Strategy for the identification of AC-specific markers. (A) Gross appearance (left) of a bone-cartilage cylinder harvested from the knee joint of a 6 weeks old minipig (the dotted lines indicate AC and GP cartilage), and Safranin-O staining of non-decalcified sections (middle), showing red staining of cartilage. The right panels show the similar morphological appearance of articular and GP chondrocytes after 10 days of tissue culture. (B) Affymetrix signal intensities for *COL2A1*, *ACAN* and *COMP* showing expression in both types of cartilage, *in vivo* and *in vitro*. (C) Affymetrix signal intensities for *ALPL*, *COL10A1* and *PTH1R* showing specific expression in GP chondrocytes. (D) Affymetrix signal intensities for *ABI3BP*, *THBS4* and *SIX1* showing specific expression articular chondrocytes. (B–D) For each sample cartilage was harvested from both knee joints of two individual animals and pooled before preparation.

Table II

Genes with increased expression in GP cartilage. Given are the Affymetrix signal intensities and the SLR for GP and AC in native tissues (*in vivo*) and cultured cells (*in vitro*) at day 10 and day 20 of differentiation

Gene	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i> d10			<i>In vitro</i> d20		
	GP	AC	SLR	GP	AC	SLR	GP	AC	SLR
COL10A1	1114	4	-7.8	2374	26	-6.2	1654	30	-5.1
SLC38A4	165	0	-7.7	297	52	-2.7	96	17	-2.2
IBSP	10642	53	-7.5	14033	203	-5.3	15675	5957	-1.3
LEF1	2407	28	-7.2	1140	178	-2.5	2031	175	-3.1
DIO2	2589	16	-6.8	4551	126	-5.3	829	278	-1.7
GPR133	133	2	-6.5	363	20	-4.3	2324	21	-3.4
ALPL	1521	24	-6.4	3056	29	-6.7	2286	90	-4.4
FLRT3	85	1	-6.2	183	18	-3.0	50	4	-2.5
EFHD1	1523	34	-5.6	2851	182	-4.2	1657	926	-0.9
CA2	353	9	-5.2	251	11	-3.8	236	14	-3.8
ANGPT1	1624	48	-5.0	1338	79	-3.9	704	216	-1.8
PTH1R	3430	135	-4.8	4864	503	-3.3	3352	1118	-1.4
ENPP2	3359	134	-4.6	2954	292	-3.3	1412	443	-1.6
A2M	716	11	-4.6	668	40	-4.0	389	67	-2.8
ADAMTS1	578	20	-4.3	678	30	-4.3	136	192	0.5
BAMBI	602	38	-4.1	1930	402	-2.4	416	299	-0.4
LRRC1	261	11	-4.1	266	40	-2.3	230	99	-1.2
OVOL1	105	5	-4.0	87	6	-2.9	190	62	-1.9
S1PR3	53	3	-3.7	5	10	-2.3	234	57	-2.3
GPR120	285	24	-3.2	716	37	-4.3	92	40	-1.0
REEP1	1096	117	-3.1	786	133	-2.4	1051	139	-2.6
VAV3	239	30	-3.0	359	37	-2.2	208	31	-2.5
SPARCL1	696	64	-2.9	2977	409	-2.8	4635	3975	-0.3
F13A1	6196	1277	-2.9	8127	661	-3.6	8943	3060	-2.1
WNT5A	132	24	-2.8	176	32	-3.1	99	87	-0.4
CAPNS1	995	117	-2.7	2128	124	-4.1	2502	530	-2.3
EPHA3	115	19	-2.7	1178	154	-3.2	891	243	-2.2
TMTC1	590	83	-2.7	559	143	-2.1	271	497	0.7
SHAS2	1029	156	-2.7	1183	206	-2.1	501	201	-1.5
GRB14	91	12	-2.6	187	9	-3.7	21	1	-4.5
MTSS1	228	39	-2.5	320	40	-2.4	311	192	-0.5
PART1	87	17	-2.4	164	40	-2.0	271	497	0.7
MAEF2C	799	153	-2.3	1462	265	-2.2	690	564	-0.6
GRIP1	236	43	-2.1	324	41	-2.1	151	93	-0.7

the lowest SLR of all genes presented on the Gene Chips, thereby confirming again the success of the chosen approach (Table II). This implies that at least some of the other genes with increased expression in GP chondrocytes might be functionally relevant for their differentiation and function. Since the primary focus of our study was however to identify genes being selectively expressed in articular chondrocytes, the results presented in Table III are even more relevant. Here we observed the highest SLR for the gene *ABI3BP*, which encodes a cytoplasmatic adaptor protein inducing cellular senescence in cancer cells. Another differentially expressed gene with a potential importance for articular chondrocyte differentiation was *GDF6*, encoding a growth factor, whose inactivation in mice causes defects of cartilage formation within the joints¹⁷. To address the question, for how long the molecular differences between GP and articular chondrocytes would persist in tissue culture, we have further compared primary cells at day 20 of differentiation, where we observed that the majority of the identified molecular markers were still differentially expressed.

Based on these results we reasoned that we could use at least some of the genes listed in Table III as markers for the quality control of TE-cartilage. For that purpose, we first performed RT-PCR expression analysis to confirm the results obtained by Affymetrix Gene Chip hybridization. Here we observed that in contrast to common cartilage markers and GP-specific markers, the expression of most of the genes listed in Table III (13 out of 19) was much higher in AC (Fig. 2), while the expression of the others was not detectable in either cartilage by RT-PCR (Supplemental Fig. 1). Another important observation was that *THBS4* and *SIX1* expression

Table III

Genes with increased expression in AC. Given are the Affymetrix signal intensities and the SLR for GP and AC in native tissues (*in vivo*) and cultured cells (*in vitro*) at day 10 and day 20 of differentiation.

Gene	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i> d10			<i>In vitro</i> d20		
	GP	AC	SLR	GP	AC	SLR	GP	AC	SLR
ABI3BP	2	475	7.7	10	579	6.0	26	665	4.1
THBS4	8	1986	6.9	13	856	4.6	16	353	4.4
SIX1	223	3717	4.1	139	961	2.8	217	2284	3.3
COL14A1	90	1177	4.0	49	1628	4.7	104	3073	4.9
PPAP2B	433	7803	3.9	201	656	2.0	260	1616	2.7
PTGS1	199	1577	3.0	76	810	3.6	73	123	0.7
TMEM30B	32	95	2.9	52	137	2.1	5	262	5.4
ESP8	333	2795	2.9	241	1351	2.0	234	896	1.9
NOV	23	70	2.8	75	1542	4.4	5918	12564	1.1
SHISA3	21	244	2.7	11	179	4.2	2	629	8.5
GAS1	29	129	2.7	22	709	4.3	57	723	3.4
GDF6	19	94	2.6	37	123	2.3	56	326	2.6
GP38K	2983	15448	2.5	81	1193	3.9	89	1395	4.2
GEM	1333	6431	2.4	238	1365	2.5	203	1278	2.7
NFI-B3	215	1109	2.4	113	442	2.0	37	316	3.1
NFIA	133	572	2.4	118	630	2.7	21	387	3.6
MMP1	160	806	2.4	29	149	2.1	124	80	-1.0
HIST1H2AC	40	222	2.1	71	459	2.3	38	55	0.8
MAP2	84	315	2.0	94	453	2.4	135	409	1.7

was barely detectable in several other tissues, thus implying a potential relevance for chondrocyte differentiation and function.

Histological, functional and molecular analysis of TE-cartilage

TE-cartilage was either generated without a carrier substance or on a hydroxyapatite (HA)-carrier [Fig. 3(A)]. The histological analysis of both types of TE-cartilage showed a well-organized extracellular matrix with regularly shaped chondrocytes [Fig. 3(B)]. Safranin-O staining additionally revealed that the proteoglycan content appeared to be higher in TE-cartilage grown on a HA-carrier, and a similar observation was made by immunohistochemistry using an antibody against type-II-collagen [Fig. 3(C)]. Inconsistent with these histological findings, we did neither observe differences in the GAG content, nor did biomechanical testing reveal statistically significant differences in the Young's Modulus, when TE-cartilage grown on a HA-carrier was compared to TE-cartilage grown without a carrier [Fig. 3(D)].

Since our expression analysis has provided the possibility for a molecular control of TE-cartilage, we went on by analyzing gene expression in four samples of TE-cartilage by RT-PCR. Here we found that *COL2A1* was expressed in all samples, whereas markers for GP cartilage were not expressed [Fig. 4(A)]. Most importantly however, we observed a high expression of *ABI3BP*, *SIX1* and *GDF6* in the two TE-cartilage samples grown on a carrier, while their expression in carrier-free TE-cartilage was lower. Interestingly, *THBS4* expression was only observed in native AC, but not in TE-cartilage, thereby demonstrating that the culture conditions still need to be improved in order to obtain a quality, which is comparable to the *in vivo* situation.

Given the potential relevance of these findings for an efficient quality control of TE-cartilage in the future, we finally performed an initial qRT-PCR expression analysis, where we compared the expression of *COL2A1*, *ACAN*, *COL10A1* and *THBS4* in native and TE-cartilage. Here we found that the expression of *ACAN* and *COL2A1* was reduced by more than 50% in TE-cartilage compared to native AC, while *COL10A1* and *THBS4* were barely expressed in TE-cartilage [Fig. 4(B)]. Taken together, these data underscore the importance of a molecular control of TE-cartilage, since ideally there should be a similar expression level of all relevant markers, when compared to the native tissue.

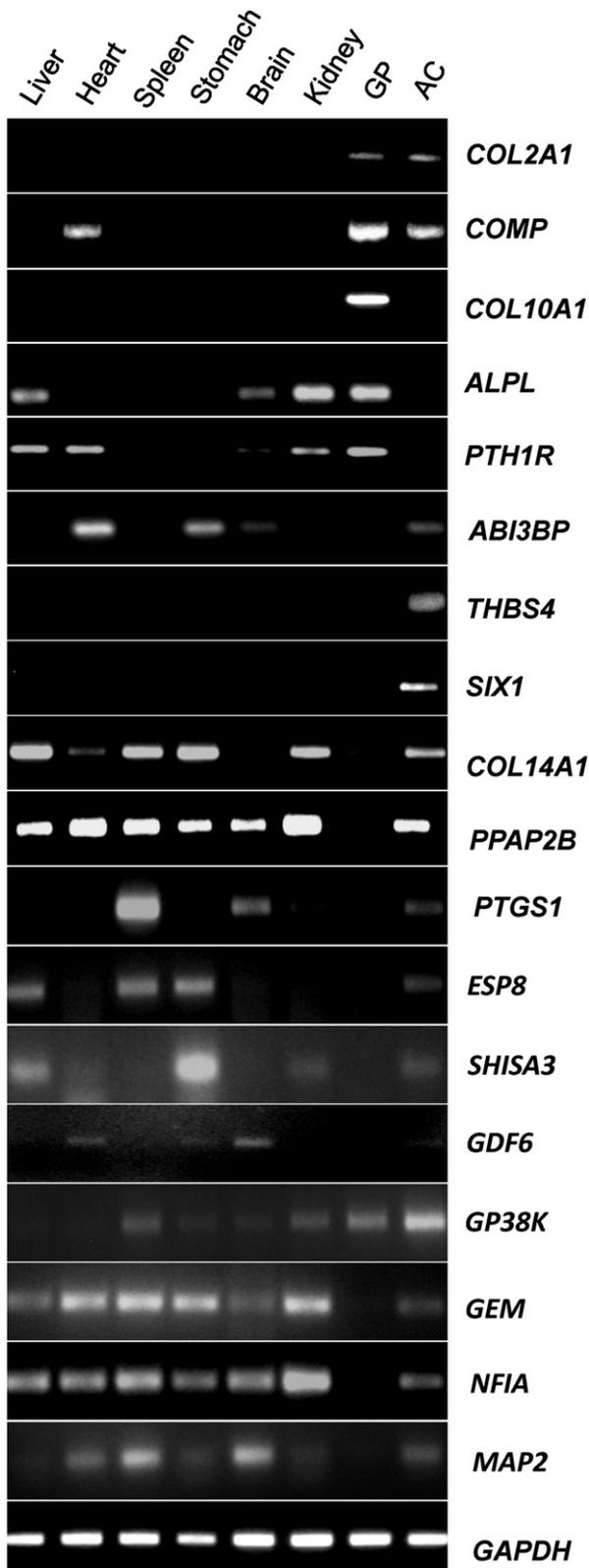


Fig. 2. Tissue-specific expression of molecular cartilage markers. RT-PCR expression analysis for the indicated genes in various porcine tissues, including GP and AC. Note that the molecular markers listed in Table III display higher expression in AC compared to GP cartilage. To confirm the results of the Affymetrix Gene Chip hybridization cartilage was harvested from knee joints of two additional animals.

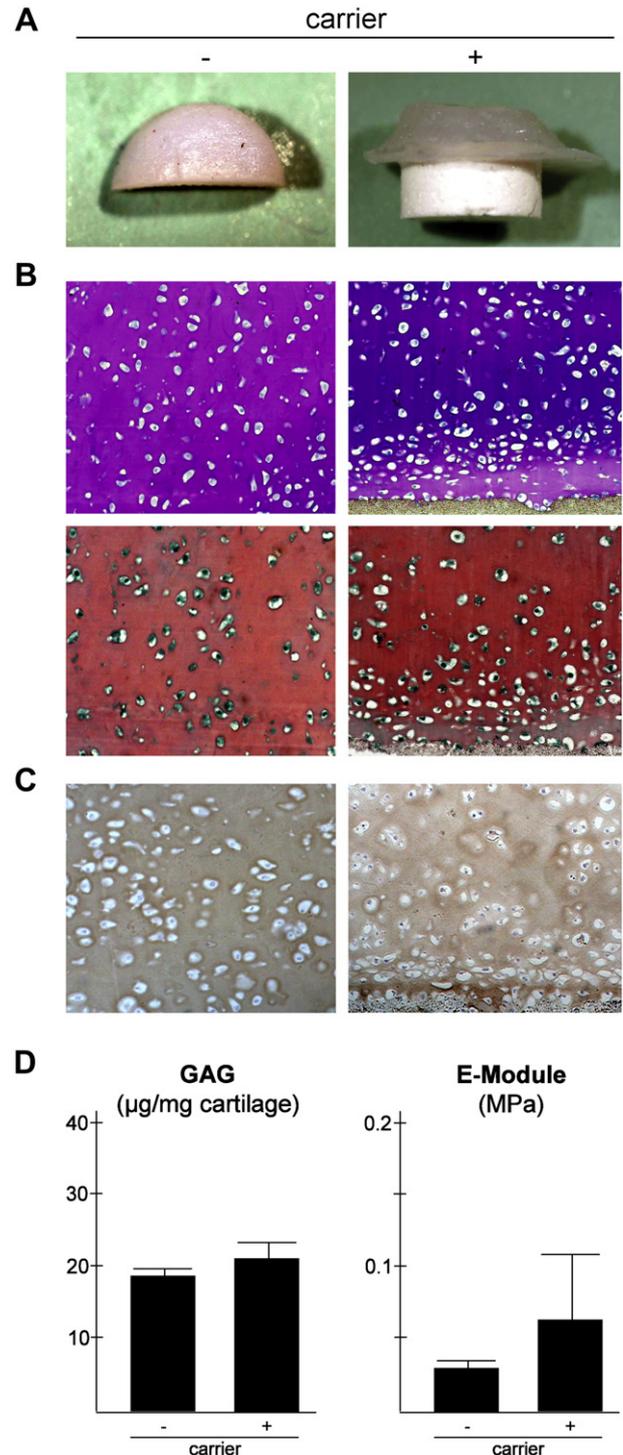


Fig. 3. Histological analysis of TE-cartilage. (A) Gross image of TE-cartilage grown without (-) or with (+) a HA-carrier. (B) Toluene blue (top) and Safranin-O (bottom) staining of TE-cartilage. (C) Immunohistochemistry with an antibody against type-II-collagen. (D) GAG content and biomechanical stability (Young's Modulus) of TE-cartilage. Values are presented as means of three independent preparations. Error bars represent 95% confidence interval. No statistical differences were noted between the two types of TE-cartilage.

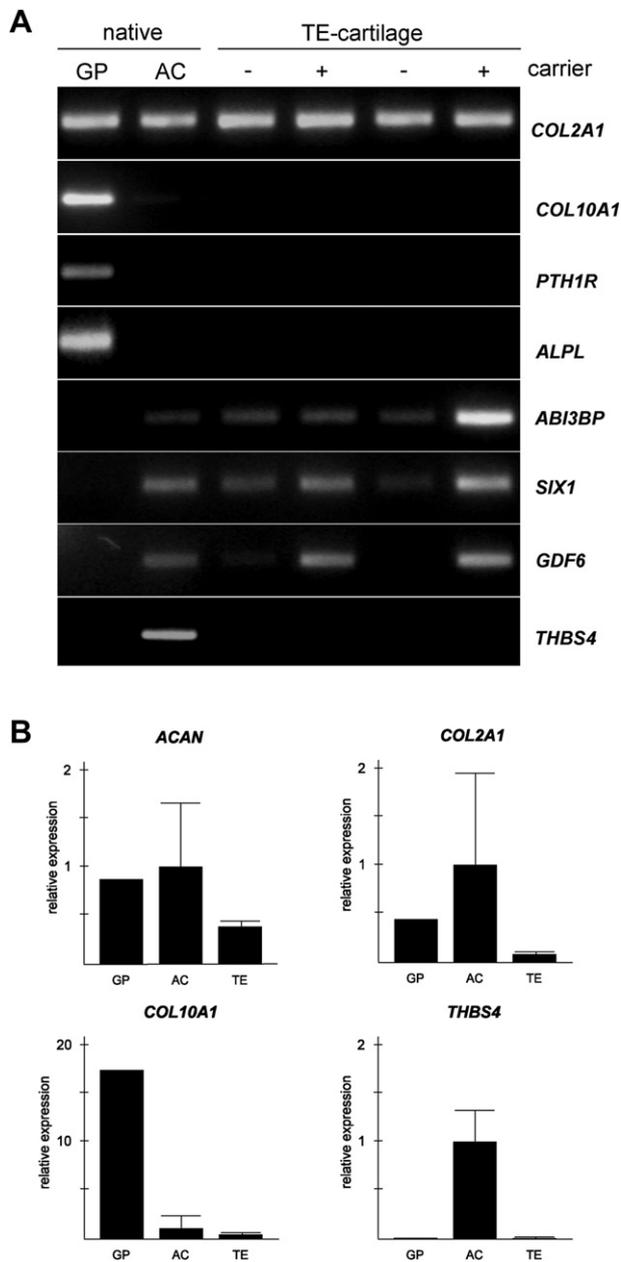


Fig. 4. Molecular analysis of TE-cartilage. (A) RT-PCR expression analysis of the indicated genes in native GP and AC, compared to four TE-cartilage preparations without (–) or with (+) carrier. (B) Quantitative RT-PCR expression analysis for the indicated genes in native GP and AC, compared to TE-cartilage grown with a HA-carrier (TE). Bars represent mean of three independent preparations for native AC and TE-cartilage (TE), and one preparation for native GP cartilage. Error bars show the 95% confidence interval about the mean position. There were no statistical differences detectable between samples isolated from AC and TE-cartilage with carrier.

Discussion

Given the fact that the therapeutic options for the treatment of OA are still limited, it is of hallmark clinical relevance to understand the molecular mechanisms regulating articular chondrocyte differentiation and function. Even though extensive research efforts have been made to identify such genes and molecular markers, little is known about the components needed to successfully create durable *in vitro* AC resembling native human cartilage^{18–20}. In this regard, it was an important first step that we were able to identify a set of genes being expressed in articular chondrocytes, but not in

chondrocytes derived from the GP. Interestingly, and this was not expected *a priori*, the molecular differences between GP and articular chondrocytes were still detectable after 10 and 20 days of tissue culture, which is a very valuable information for the generation of TE-cartilage. Most importantly however, our results have provided the possibility for an efficient quality control of TE-cartilage, since the sole histological analysis has obvious limitations.

In this regard, we believe that it is rather a strength than a weakness of our manuscript, that we were not able to detect expression of *THBS4* in the four analyzed TE-cartilage samples, unlike it was the case for other molecular markers of AC. Also, typical markers of bone such as *Osterix (OSX)* and *RUNX2* were not detectable in TE-cartilage by RT-PCR (Supplemental Fig. 2). In fact, this finding underscores, why it is important to compare gene expression in TE-cartilage to the native tissue, since it is reasonable to speculate that at least some of the identified molecular markers are also functionally relevant for tissue integrity. Moreover, by monitoring gene expression in TE-cartilage, it will be possible to optimize the culture conditions, for instance by supplementing the medium with additional growth factors, such as GDF6.

In our study we have identified at least 13 genes that are expressed at higher levels in articular compared to GP cartilage and that might be used for the quality control of TE-cartilage in future experiments. Since we have used a porcine model however, there is a likely possibility that we did not identify all putative articular chondrocyte markers, which is readily explained by the fact that the porcine Gene Chips do not represent the same number of genes yet as the human or murine Gene Chips. In this regard, it is important to state that a similar approach has previously been performed with GP and AC from wildtype mice²¹. To overcome the limited amount of extractable RNA from the corresponding mouse tissues, the authors have used laser capture microdissection and amplified the RNA by *in vitro* transcription, before performing Affymetrix Gene Chip hybridization. This has led to the identification of 27 genes with at least 10-fold higher expression in articular chondrocytes, four of them (*SIX1*, *PPAP2B*, *COL14A1* and *GAS1*) also identified by us, while five others (*IGFBP5*, *TMEM30B*, *ANK*, *NFIB* and *SOCS3*) displayed a more than two-fold increase in native AC in our experiments (data not shown). Although we can only speculate, why these authors did not identify other genes, such as *ABI3BP* or *THBS4*, in their comparative analysis, it is important to state that 11 of the 27 genes listed by Yamane *et al.* were not presented on the porcine Gene Chips, one of them being *PRG4* (encoding Lubricin, also known as Superficial zone protein), which has been long considered as a specific marker of articular chondrocytes²². Given this argumentation, it will be important to use both sets of data in order to screen for ideal markers for the quality control of TE-cartilage in the future.

Regardless of this issue however, we further believe that the genes identified in our study are not only excellent markers for the quality control of TE-cartilage, but also some of them may even serve as promising targets for therapeutic approaches. In this regard, it will be important to study the functional relevance of candidate genes for articular chondrocyte differentiation and for the integrity of the produced extracellular matrix. Although, it might be worthwhile to do this systemically for all of the identified markers in future experiments, the genes *ABI3BP*, *THBS4*, *SIX1* and *GDF6* appear to be particularly interesting, either based on their expression pattern, or given the previous knowledge published by others.

In fact, while *GDF6* is already known to play a key role in cartilage formation and joint development¹⁷, *ABI3BP* has been described as a senescence-inducing gene in different cell types²³. Thus, given the fact that articular chondrocytes are embedded into their own extracellular matrix for long periods, they appear to be in a state of cellular senescence, and *ABI3BP* may be one of the factors promoting this

state. Cellular senescence has been associated with OA, but despite great research efforts little is known about specific mechanisms and genes initiating senescence in chondrocytes^{24,25}. It has additionally been suggested that progressive cell senescence might decrease the ability of chondrocytes to maintain and restore AC²⁴. Albeit interesting, it is unlikely that such a potential role of ABI3BP will eventually result in the development of a therapeutic agent stimulating articular chondrocyte regeneration, since *ABI3BP* is expressed in many other tissues and since it has an intracellular localization.

The same is true for *SIX1*, which encodes a homeobox transcription factor located in the nucleus²⁶. That *SIX1* has other functions besides regulating chondrogenesis is well accepted, since mutations within the *SIX1* gene cause branchio-oto-renal syndrome, being characterized by branchial and renal anomalies, together with deafness and preauricular pits^{27,28}. Likewise, *Six1*-deficient mice showed abnormal development of the inner ear, nose, thymus, kidney and skeletal muscle and died immediately after birth²⁹. Affection of articular or GP cartilage was not reported, since homozygous mutants were apnoeic and died immediately after birth. A markedly reduced skeletal muscle mass of the trunk, limbs, diaphragm and tongue was found. No observations regarding AC were made. It is therefore not known, if these mice were born with pathologically altered AC or if they might have developed OA during lifetime.

In this regard, it will be most promising to study the role of the extracellular matrix protein *THBS4* for AC integrity in future experiments. In fact, *THBS4* showed the highest specificity for AC expression in our RT-PCR screening, which is important, since the other four members of the thrombospondin family were expressed in both, GP and AC (data not shown). Moreover, while most of the other thrombospondins, especially *THBS1*, *THBS2* and *COMP* (also known as *THBS5*), have been functionally studied extensively^{30,31}, there is nearly no published information so far concerning the physiological role of *THBS4*. In this regard it will be useful to analyze the skeletal phenotype of *Thbs4*-deficient mice with a special focus on AC thickness and regeneration.

Regardless of these functional studies however, our study has provided novel options to control the quality of TE-cartilage. This is of hallmark importance since information regarding the influence of chondrocyte quality for the clinical outcome of tissue engineering applications such as ACI or the implantation of TE grafts remains is still very limited³². Since the approach in quality control of chondrocytes presented in this study might eventually lead to improved clinical results in OA, we believe that they are of immediate clinical relevance.

Author contributions

AB, TNH, and JMP performed molecular research and contributed equally to this study. TS performed Affymetrix gene array. KW, CG, and RP designed and developed TE-cartilage. FTB performed minipig operations and harvested cartilage. JA and JS analyzed and interpreted gene array data and contributed important statistical expertise. PU and JPP isolated and collected animal tissues for multi tissue PCR. NMM, TS and MA designed this study, revised the article critically for important intellectual content and gave final approval for its submission.

Role of the funding source

This study was supported by grants of the German Research Community DFG Am 103/11-1 to MA and DFG PO413-7-1 to RP. This source had no involvement in the study design, collection, analysis or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to submit the manuscript for publication.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs Olga Winter for her technical assistance with histologies performed in this study.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.joca.2010.10.002.

References

- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum* 2008;5:15–25.
- Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc* 2009;108:87–101.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889–95.
- Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, *et al.* A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85:223–30.
- Ergelet C, Sittlinger M, Lahm A. The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy* 2003;19: 108–10.
- Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, *et al.* Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 2008;36:2091–9.
- Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, *et al.* Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R60–73.
- Kreuz PC, Steinwachs M, Erggelet C, Lahm A, Henle P, Niemeyer P. Mosaicplasty with autogenous talar autograft for osteochondral lesions of the talus after failed primary arthroscopic management: a prospective study with a 4-year follow-up. *Am J Sports Med* 2006;34:55–63.
- Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):25–32.
- Mithoefer K, Hambly K, Della Villa S, Silvers H, Mandelbaum BR. Return to sports participation after articular cartilage repair in the knee: scientific evidence. *Am J Sports Med* 2009;37(Suppl 1):167S–76S.
- Petersen JP, Uebliacker P, Goepfert C, Adamietz P, Baumbach K, Stork A, *et al.* Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:2029–38.
- Nagel-Heyer S, Goepfert C, Morlock MM, Portner R. Relationship between physical, biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered cartilage-carrier-constructs. *Biotechnol Lett* 2005;27:187–92.
- Nagel-Heyer S, Goepfert C, Feyerabend F, Petersen JP, Adamietz P, Meenen NM, *et al.* Bioreactor cultivation of three-

- dimensional cartilage-carrier-constructs. *Bioprocess Biosyst Eng* 2005;27:273–80.
14. Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE. Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res* 1999;253:681–8.
 15. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 1992;10:745–58.
 16. Korhonen RK, Laasanen MS, Toyras J, Rieppo J, Hirvonen J, Helminen HJ, et al. Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *J Biomech* 2002;35:903–9.
 17. Settle Jr SH, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol* 2003;254:116–30.
 18. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum* 2001;44:1608–19.
 19. Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W. Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:284–92.
 20. Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, et al. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum* 2007;56:586–95.
 21. Yamane S, Cheng E, You Z, Reddi AH. Gene expression profiling of mouse articular and growth plate cartilage. *Tissue Eng* 2007;13:2163–73.
 22. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1994;311:144–52.
 23. Latini FR, Hemerly JP, Oler G, Riggins GJ, Cerutti JM. Re-expression of ABI3-binding protein suppresses thyroid tumor growth by promoting senescence and inhibiting invasion. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:787–99.
 24. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):106–10.
 25. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002;1:57–65.
 26. Oliver G, Wehr R, Jenkins NA, Copeland NG, Cheyette BN, Hartenstein V, et al. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* 1995;121:693–705.
 27. Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, et al. *SIX1* mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of *EYA1-SIX1*-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8090–5.
 28. Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, et al. Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of *SIX1*, *SIX6*, and *OTX2* resulting from a complex chromosomal rearrangement. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2480–9.
 29. Ozaki H, Nakamura K, Funahashi J, Ikeda K, Yamada G, Tokano H, et al. *Six1* controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development* 2004;131:551–62.
 30. Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (*TSP1*) dictates the course of wound healing in double-*TSP1/TSP2*-null mice. *Am J Pathol* 2002;161:831–9.
 31. Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1115–25.
 32. Pietschmann MF, Horng A, Niethammer T, Pagenstert I, Sievers B, Jansson V, et al. Cell quality affects clinical outcome after MACI procedure for cartilage injury of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17:1305–11.

10 Eidesstattliche Versicherung

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.

Hamburg, 24. November 2010

Tim-Nicolas Hißnauer