Tissue Engineering von humanem Knorpel – Vorteile eines 3-Phasen *in vitro* Modells

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Frank Feyerabend
aus Wuppertal

Hamburg 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
Auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 24. Oktober 2003

Hamburg, den 10. Oktober 2003

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Danksagung

Frau Prof. Dr. U. Beisiegel danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf der Universität Hamburg.

Herrn Prof. Dr. H. Bretting danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Herrn PD Dr. P. Adamietz danke ich für die Heranführung an das Thema und die Themenstellung, die große Diskussionsbereitschaft und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und alle gemeinsamen Aktivitäten.

Weiterer Dank gebührt der Arbeitsgruppe von PD Dr. R. Pörtner an der TU Hamburg-Harburg für den Ideenaustausch und viele Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Jan.

Einen ganz besonders großen Dank schulde ich meiner Familie, Birte, Finn und Carlotta, die mich immer unterstützt hat, aber manchmal unter der Arbeit leiden musste.

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Charakterisierung des Gelenkknorpels 1
1.1.1. Molekularer Aufbau 1
1.1.2. Architektur 3
1.1.3. Besonderheiten 5
1.2. Klinische Relevanz und Methoden der Reparierung 7
1.3. Darstellung der Komplexität der Knorpelneubildung 8
1.3.1. Dedifferenzierung 8
1.3.2. Chondrogenese 9
1.3.3. Redifferenzierung 9
1.3.4. (Re-)Differenzierungsignale 11
1.3.5. spezifische Faktorenwirkung in unterschiedlichen Aktivitätsphasen 12
1.4. Chancen des Tissue-Engineering 13
1.5. Besondere Probleme mit humanen Chondrozytenkulturen 14
1.6. Fragestellungen der Arbeit 15
2. Material und Methoden 16
2.1. Zellkultur 16
2.1.1. Gewinnung und Isolierung der Chondrozyten 16
2.1.2. Gewinnung von Humanserum 17
2.1.3. Zellpräparationen 17
2.1.4. Zellzählung 18
2.1.5. Proliferation und Passagierung 18
2.1.6. Bedingungen zur Redifferenzierung der Chondrozyten 19
2.1.7. Herstellung von Knorpelpellets 20
2.2. Analytik 21
2.2.1. DNA-Bestimmung 21
2.2.2. GAG-Bestimmung 22
2.2.3. Semiquantitative Kollagen-Bestimmung 22
2.2.4. Histologie 24
2.3. Auswertung und Statistik 26
2.3.1. Anzahl der Proben 26
2.3.2. GAG-Werte, DNA-Werte und G/D-Verhältnis 27
2.4. DNA-Eichkurve 27
2.4.1. Schweinechondrozyten 27

2.4.2. Humane Chondrozyten 28
3. Ergebnisse 30
3.1. Bestimmung der Zellzahl auf dem Träger (Calcibon) 30
3.2. Proliferation von humanen Chondrozyten 31
3.3. Abhängigkeit der Chondrogenesefähigkeit humaner Chondrozyten von der Passage und dem Alter des Spenders 35
3.4. Faktorenabhängiges Chondrogenesepotential im 2-Phasen System 39
3.5. Redifferenzierung der Zellen im Alginatsystem 41
3.5.1. Morphologie 41
3.5.2. Einflussfaktoren: Sauerstoffpartialdruck, Serum und Verweildauer 42
3.5.3. Optimierung der Redifferenzierung 46
3.5.3.1. Einfluss von Interleukin-4 46
3.5.3.2. Einfluss von TGF-β_1 48
3.5.4. Einfluss von PDGF-BB 50
3.6. Einfluss einer separaten Redifferenzierungsphase auf das Chondrogenesepotential von in vitro expandierten Chondrocyten 53
3.6.1. Effekt von reduziertem Sauerstoffpartialdruck und Wachstumsfaktoren auf Matrix-Syntheseraten in high-density-Kulturen nach Redifferenzierung 53
3.6.2. Anpassung der Kulturbedingungen an die unterschiedlichen Aufgaben der Chondrozyten während der Redifferenzierungs- und Chondrogenese-Phase (Phase 2 und Phase 3) 57
3.6.3. Stimulation der Chondrogenese nach Unterstützung der Redifferenzierung durch TGF-β_1 60
3.6.4. Indirekte Beeinflussung der Chondrogenese nach vorausgehender Stimulierung der Redifferenzierung durch PDGF-BB 66
3.6.5. Direkte Beeinflussung der Chondrogenese nach vorausgehender Stimulierung der Redifferenzierung durch PDGF-BB 71
3.7. Erhöhung des Chondrogenesepotentials durch Interleukin-4 (IL-4) 73
3.7.1. Einfluss auf die Matrixsynthese 73
3.7.2. Einfluss auf die Kollagenproduktion 76
3.8. Darstellung der Komplexität des drei-Phasen-Systems und der unterschiedlichen Wirkung einer Faktorenzugabe am Beispiel von PDGF-BB 77
3.8.1. Permissive Wirkungen von PDGF bei Applikation während der Proliferationsphase (Phase 1) 77
3.8.1.1. Einfluss von PDGF im Wachstumsmedium auf GAG- und Kollagensynthese während der Redifferenzierungsphase 78

3.8.1.2. Einfluss von PDGF im Wachstumsmedium auf GAG- und Kollagensynthese während der Chondroneogenese-Phase 80
3.9. Gewichtsverteilung der gebildeten Knorpelpellets 84
3.9.1. Korrelation Gewicht zu GAG 84
3.9.2. Einfluss von Interleukin-4 auf das Gewicht der Pellets 86
4. Diskussion 87
4.1. Relevanz des DNA-Gehaltes und Einführung des G/D-Verhältnisses 87
4.2. Proliferation der Chondrozyten 87
4.2.1. Proliferation 87
4.2.2. Dedifferenzierung der Chondrozyten während der Proliferation und Bildung von „Subpopulationen“ 88
4.3. Möglichkeiten und Grenzen des 2-Phasen-Systems (high-density-Kultur) bei humanen Chondrozyten 89
4.4. Vorteile und Einflussgrößen der zusätzlichen Redifferenzierungsphase 91
4.4.1. Auswahl des Kultursystems 91
4.4.2. Marker für die Redifferenzierung 91
4.4.3. Induktion der Redifferenzierung durch die Einbettung in Alginat – Vergleich zwei- und drei-Phasen-System 92
4.4.4. Sauerstoff als Differenzierungssignal 93
4.5. Einfluss von Wachstumsfaktoren 95
4.5.1. IGF-I unterstützt die Redifferenzierung und die Chondroneogenese 95
4.5.2. TGF-β_1 beeinflusst den Differenzierungsgrad und die Chondrogeneseleistung der Zellen 96
4.5.3. Interleukin-4 stimuliert die Bildung von Proteoglykanen 98
4.5.4. PDGF-BB wirkt permissiv, unterstützt die Redifferenzierung und interagiert mit Interleukin-4 101
4.6. Parameter für die Beurteilung des erreichten Grades der Redifferenzierung und der Knorpelpellets 103
4.7. Implikationen der Ergebnisse für tissue-engineerten Knorpel 105
5. Zusammenfassung 107
6. Literaturverzeichnis 108
7. Anhang 118
7.1. Abkürzungsverzeichnis 118

1. Einleitung

1.1. Charakterisierung des Gelenkknorpels

Gelenkknorpel erlaubt ein extrem reibungsloses Gleiten der Gelenke, das jede Bewegung des Skeletts begleitet. Erst bei einer Beeinträchtigung der Funktion wird wahrgenommen, wie häufig solche Bewegungen stattfinden. Der Gelenkknorpel zeichnet sich vor allem durch folgende Merkmale aus: er hält einerseits hohe Belastungen durch Druck, Biegung und Zug aus, andererseits muss er formstabil sein. Er dient als Stossdämpfer der Knochen, verteilt auftretende Kräfte durch Deformation weit im Gelenk. Unterstützt wird das nahezu reibungslose Gleiten der Gelenke durch das Zusammenspiel mit der Synovialflüssigkeit Das Besondere daran ist, dass er von einem einzigen Zelltyp, dem Chondrozyten, aufgebaut wird.

Chondrozyten sind in differenziertem Zustand mit ihrer runden Morphologie zwar visuell unscheinbar, funktionell jedoch höchst komplex. Sie bilden sowohl den Knorpel, wie auch die temporären „Schablonen“ für die Knochenbildung während der Embryonalentwicklung.

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Knorpel, Faser-, elastischen und hyalinen Knorpel. Gelenkknorpeloberflächen bestehen meist aus hyalinem Knorpel. Er enthält neben den Chondrozyten die von ihnen gebildete extrazellulären Matrix, die zusammen mit den Kollagenfasern für die Funktion des Knorpels verantwortlich sind. Diese besteht zu 70-80 % aus Wasser, das im Zusammenspiel mit einigen anderen Molekülen der Matrix (s. u.) für die Kompressionsfähigkeit des Knorpels verantwortlich ist. Knorpel steht zwar in der Regel nur intermittierend unter Druck, wenn eine Belastung des Gelenks stattfindet, dieser Druck kann jedoch sehr hoch sein (100-200 Atm. beim Stehen, 40-50 Atm. beim Gehen) (Woessner, 1991; Sah et al., 1989). Zur Verdeutlichung: Die Kräfte, die auf ein Gelenk wirken, betragen beim Gehen 300 % des Körpergewichtes, und können bei außergewöhnlichen Belastungen bis zu 800 % des Körpergewichts erreichen (Bergmann et al., 1993).

1.1.1. Molekularer Aufbau

Die Kollagenfasern machen zwischen 50 und 90 % des Trockengewichts des Knorpels aus. Sie sind lineare Moleküle, die von drei α-Ketten gebildet werden. Von diesen besitzt jede eine spezifische Tripeptidsequenz $(gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, die zu der Bildung von *left-handed* Helices führt. X und Y sind Aminosäurereste, meistens Prolin, Lysin und deren modifizierte Formen, Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Drei dieser Helices lagern sich zu einer *right-handed* Helix zusammen. Diese kompakte Helix ist nur aufgrund der regelmäßigen Anordnung von Glycin möglich, das klein genug ist, um sich im Inneren der Helix anzuordnen. Mehrere solcher Helices lagern sich zu Kollagenfasern zusammen (Muir, 1995; Wolfe, 1993).

Kollagene werden aus Prokollagenen gebildet, die große C- und N-terminale Anhänge besitzen, die unter anderem für die Helixbildung notwendig sind. Nach deren Abspaltung durch Prokollagen C-Proteinase beginnen die Fibrillen eine Selbstzusammensetzung zu Fasern (Fertala et al., 1994).

Einige Kollagen-Typen sind ausschließlich im Knorpel zu finden. Dazu gehören die Kollagene Typ II, VIII, IX und XI. Die Kollagene bilden ein dichtes Netzwerk aus Fasern, die für die mechanische Stabilität des Knorpels verantwortlich sind. Kollagen XI bildet mit Kollagen II und IX gemischte Fasern, wobei das Kollagen XI den Kern der Faser bildet, um die herum sich die Typ II-Fibrillen orientieren (Petit et al., 1996). Kollagen IX liegt auf der Oberfläche der Kollagen II-Fibrillen und bildet Querverbindungen zwischen C- und N-Terminus von angrenzenden Kollagen II-Fibrillen. Dabei lagern sich die beiden Kollagenmoleküle (II und IX) antiparallel aneinander und erlauben dadurch eine Verbindung zwischen Kollagen II-Fasern, die zu einem dichten Netzwerk führen, das bis zu einem gewissen Grad komprimierbar ist. Die Querverbindungen werden über Pyridinolin- und Hydroxylysinonorleucin-Querbrücken hergestellt (Wu et al., 1992). Eine weitere Stabilisierung erfolgt durch kovalente Querverbindungen zwischen Kollagen II-Fibrillen, die über Pyridinolin-Querbrücken erreicht werden. Auch dadurch erhält der Knorpel seine Elastizität, während er durch die Zugfestigkeit der Kollagenfasern (eine 1 mm dicke Kollagenfaser reißt erst bei einer Belastung von 10 kg) die Formkonstanz und die große Belastbarkeit erhält.

Bei intaktem, ausgereiftem Knorpel ist das Kollagennetzwerk fertig ausgebildet und hat eine sehr hohe Lebenserwartung ($t_{1/2}$ < 100 Jahre, (Steadman et al., 1997). Umstrukturierungen sind nicht oder nur sehr begrenzt möglich. Eine gewisse Remodellierung oder Reorganisation könnte durch höheren Umsatz anderer, kleinerer Kollagene (z. B. Typ IX oder XI) möglich sein (Eckstein et al., 2001).

Ein weiteres wichtiges, aber nur in geringen Mengen vorkommendes Molekül im Knorpel ist die Hyaluronsäure. Sie gehört zur Gruppe der Glycosaminoglycane (GAG) und besteht aus bis zu mehreren Tausend Zuckerresten, die aus einem sich wiederholenden Disaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin gebildet werden. Im Gegensatz zu anderen GAGs sind die Zuckerreste nie sulfatiert Sie hat mehrere Funktionen. Zum ersten bildet sie ein Gel, an das sich Chondrozyten über einen Oberflächenrezeptor (CD 44) anheften und dadurch interzelluläre Aggregate bilden können (Chow et al., 1995). Zum zweiten spielt sie eine große Rolle bei der Organisation und Verteilung der Matrixmoleküle. Drittens bildet sie den Kern von großen, multimolekularen Aggregaten, die für die Funktion des Knorpels ebenfalls essentiell sind.

Diese Aggregate bestehen aus verschiedenen Bestandteilen. Hyaluronsäureketten bilden den Kern, an den sich viele Aggrecane und das Link-Protein anlagern.

Aggrecan, ein knorpelspezifisches Proteoglykan, besteht aus einem Kernprotein (Polypeptid), an das in seiner ganzen Länge etwa 100 Chondroitinsulfatketten (GAG, Disaccharid: D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Galactosamin) und etwa 30 Keratansulfatketten (GAG, Disaccharid: D-Galactose und N-Acetyl-D-Glucosamin) angeheftet sind. Es gehört zur Familie der Hyaloadherine, einer Gruppe von Proteoglykanen, die an Hyaluronsäureketten mit hoher Affinität binden. Diese Bindungsstelle wird zusätzlich durch das Link-Protein gebunden, das zusätzlich noch mal an die Hyaluronsäurekette bindet (Kimura et al., 1980). Dadurch bilden sich tertiäre Komplexe, die für eine sehr große Stabilität der Verbindung sorgen, und dafür, das kaum Dissoziation dieser Moleküle messbar ist (Hardingham, 1979). Die Komplexe aus diesen Bestandteilen können über 100 Aggrecane enthalten und haben dadurch Molekulargewichte bis zu 3 Millionen Dalton.
Durch ihre Größe werden sie im Kollagen-Netzwerk immobilisiert. Da die Aggrecane hauptsächlich durch das Chondroitinsulfat, ein Glycosminoglykan, stark sulfatiert sind, akkumulieren sie bei physiologischem pH-Wert eine große Menge negativer Ladungen. Als Folge davon haben sie die Tendenz, eine große Menge Wasser zu binden und stark an zu schwellen, was wiederum durch das dreidimensionale Kollagennetzwerk begrenzt wird. Dadurch steht der Knorpel auch in unbelastetem Zustand unter Druck. Diese Wechselwirkung zwischen der Schwellung des Knorpels und dem Rückhalt durch das Kollagennetzwerk macht fast 50 % der mechanischen Kompressionsfähigkeit des Knorpels aus (Lai et al., 1991) und wird durch die Stabilisierung mit Link-Protein noch verstärkt (Zhu et al., 1991). Bei einer Belastung wird das Wasser in ungeladene Bereiche gepresst, wenn die Belastung endet, ziehen die aggregierten, immobilisierten Aggrecane das Wasser wieder zurück. Das erklärt die Stoßdämpferfunktion des Gelenkknorpels (Sah et al., 1989). Außerdem wird so ein Ausstrom des Wassers aus dem Knorpel heraus vermieden. Die Wichtigkeit des Aggrecans zeigt sich bei der cmd (*cartilage matrix defiency*) der Maus, einer autosomalen rezessiven Mutation. Hier liegt eine Deletion im Aggrecan-Gen vor. Die Mäuse haben eine Gaumenspalte, kurze Gliedmaßen, Schwanz und Schnauze sind ebenfalls verkürzt. Homozygot führt diese Mutation sofort nach der Geburt zum Tod (Watanabe et al., 1994).

1.1.2. Architektur

Gelenkknorpel ist in hohem Maße strukturiert. Die Zusammensetzung, Organisation und die mechanischen Eigenschaften der Matrix variieren in Abhängigkeit von der Entfernung zur Knorpeloberfläche. Bedingt durch diese Unterschiede lässt sich der Knorpel in vier Bereiche / Zonen unterteilen: Oberflächenzone, Übergangszone, Radiale Zone und calzifizierte Zone.
In der Oberflächenzone befindet sich das dichteste Netzwerk (Haut aus Kollagen I) aus Kollagenfasern. Dieses liegt parallel zur Gelenkoberfläche. Die Kollagenfasern in dieser

Zone sind dünner (< 1µm) und dichter gepackt als in den anderen Zonen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen mechanischen Funktionen erfüllt das Kollagennetzwerk auch noch eine Funktion als „Haut“ des Knorpels. Es bildet eine Immunbarriere zwischen der Synovialflüssigkeit und dem Knorpelgewebe, die ein Eindringen großer Moleküle (z. B. Antikörper) von außen, sowie das Austreten von Matrixmolekülen verhindert. Die in dieser Region liegenden Chondrozyten sind leicht ellipsoid abgeflacht. Ihre Längsachse liegt parallel zur Oberfläche. Der Wassergehalt ist in dieser Zone am höchsten. Die „Schmierung“ des Gelenkes erfolgt über das in dieser Region sehr stark vertretene Proteoglykan Lubricin (oder *superficial zone protein*), das dem Knorpel einen Friktionskoeffizienten nahe null (niedriger als Eis, das auf Eis gleitet) verschafft (Bohme et al., 1995; Jay et al., 2000).
Die Übergangszone bildet, wie der Name bereits andeutet, den Übergang zwischen der Oberflächen- und der radialen Zone. Die Kollagenfasern sind zufällig schräg zur Oberfläche angeordnet. Die Chondrozyten sind rund und produzieren eine Matrix, die aus dickeren Kollagenfasern als in der Oberflächenzone und mehr Proteoglykanen besteht.
Die radiale Zone zeichnet sich dadurch aus, dass sie säulenartig aufgebaut ist. Diese Säulen bestehen aus mit Wasser und runden Chondrozyten gefüllten Kollagenröhren mit einem Innendurchmesser von 1-2 µm. Die Säulenwände werden aus dicht gepackten Kollagenfasern gebildet, die in Längsrichtung zusätzlich helical ausgerichtet sind Das Lumen ist in regelmäßigen Abständen (50 – 70 nm) mit umlaufenden 10 nm-Fibern ausgekleidet (Ap Gwynn et al., 2000). Der Proteoglykangehalt ist in dieser Zone am höchsten, der Wassergehalt am niedrigsten (Abbildung 1).
Die dünne, calzifizierte Zone bildet den Übergang zwischen der radialen Zone und dem subchondralen Knochen. Die Zellen dieser Zone sind kleiner als die der darüber liegenden Zonen und zum Teil vollständig von calzifiziertem Knorpel umgeben. Ihre metabolische Aktivität ist sehr niedrig.

Die Chondrozyten bilden in nativem Knorpel so genannte Chondrone (Abbildung 1). Diese bestehen aus einer oder mehreren Zellen, die von feinen Fibrillen umgeben sind. Bestandteile sind unter anderem Kollagen Typ II, VI und IX, sulfatierten GAGs, Tenascin und Fibronectin (Gardner, 1994). Chondrone stellen Flüssigkeitsgefüllte, druckresistente Blasen dar, die die Einflüsse der dynamischen Belastung (mechanisch, osmotisch, physikochemisch) dämpfen und damit die Zellen schützen. Zwischen den Chondrozyten bestehen im Allgemeinen keine direkten Zell-Zell-Kontakte.

Die extrazelluläre Matrix wird in verschiedene Bereiche aufgeteilt. Die perizelluläre Matrix liegt im direkten Kontakt mit den Zellen und enthält viele Proteoglykane, Kollagen Typ VI und kaum fibrilläres Kollagen. Daran anschließend befindet sich die territoriale Matrix, in die die

Chondrozyten cytoplasmatische Ausläufer bilden. Diese besteht hauptsächlich aus dünnen Kollagen II-Fibrillen, die die Chondrozyten korbartig einschließen und dadurch die Chondrone bilden. Diese Matrixkompartimente machen weniger als 10 % der Gesamtmatrix. Das dritte Kompartiment, die interterritoriale Matrix (auch als *further removed matrix* bezeichnet) bildet den Hauptanteil der Matrix und besteht unter anderem aus den oben angegeben Molekülen, z. B. Kollagen II, Aggrecan, Proteoglykane (Häuselmann et al., 1992; Buckwalter und Mankin, 1997a).

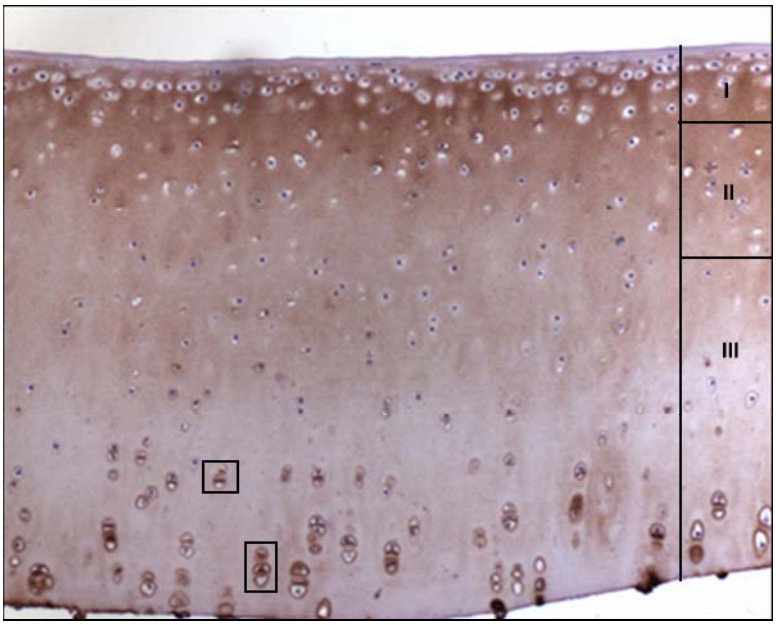


Abbildung 1: Aufbau des Gelenkknorpels. Zu sehen ist die Gliederung des Knorpels in die Oberflächenzone (I), die Übergangszone (II) und die radiale Zone (III). Durch die Rechtecke werden die Chondrone markiert. Zwischen den Chondrozyten befindet sich die extrazelluläre Matrix. Immunhistologische Färbung (Kollagen II), 40fache Vergrößerung.

1.1.3. Besonderheiten

Gelenkknorpel ist avaskulär und nicht innerviert. Durch die fehlende Versorgung mit Blut ergeben sich im ausgereiften Knorpel einige Besonderheiten des Gewebes. Die Versorgung der Zellen erfolgt nur unidirektional von der Synovialflüssigkeit in die Matrix, da der unter dem Knorpel liegende Knochen und die calcifizierte Knorpelzone einen Stofftransport von unten verhindern.

Durch das dichte Kollagennetzwerk in der Oberflächenzone ist nur ein begrenzter Stoffaustausch mit der Synovialflüssigkeit möglich. Dabei treten die Moleküle nur im oberen Bereich des Knorpels ein. Die wechselnde Belastung führt dazu, dass sich Gewebsflüssigkeit schnell durch den Knorpel verschiebt und verteilt. Durch diesen *fluid flow* ist es möglich, dass sich Nährstoffe, Substrate, neu gebildete Matrixkomponenten und Botenstoffe schneller als allein durch Diffusion durch den Knorpel bewegen. Diese „aktive

Diffusion“ reicht aus, die im Knorpel verhältnismäßig geringe Anzahl von Zellen ausreichend zu ver- und entsorgen. Die Matrix stellt ebenfalls eine Barriere dar, vor allem durch die Aggrecan-Komplexe. Große und stark geladene Moleküle, hauptsächlich untersucht wurden bivalente Kationen, können sich nicht unbeeinflusst durch die Matrix bewegen, sondern werden stark retentiert (Maroudas, 1970).
Ebenfalls Folge der Avaskularität ist der sehr niedrige Sauerstoffpartialdruck im Gewebe, der bis auf 1 % absinken kann (gegenüber 24 % O_2 in der Atmosphäre; Brighton und Happenstall, 1971). Aufgrund dieses niedrigen O_2-Gehalts ist es auch nicht verwunderlich, dass Chondrozyten ihren Energiebedarf in weit höherem Maße als andere Zellen durch anaerobe Glykolyse decken.
Die vermehrte Milchsäureproduktion führt nach Einstellung des Gibbs-Donnan-Gleichgewichts im Vergleich zu anderen Geweben zu einem niedrigeren pH-Wert im Knorpel. Daneben sind sie in vivo deutlich höheren Osmolaritäten (etwa 380 mOsm) ausgesetzt als die meisten anderen Zelltypen (etwa 280 mOsm) (Muir, 1995).

Im normal belasteten Knorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Proteoglykanen (PG). Durch höhere Belastungen, die z. B. beim Sport auftreten, verschiebt sich das Gleichgewicht aufgrund der mechanischen Einflüsse solange zum anabolen PG-Metabolismus, bis die erforderliche Stabilität erreicht ist (Eckstein et al., 2001).Chondrozyten regulieren ihre eigene Stoffwechselaktivität als Antwort auf die auftretenden mechanischen Belastungen und die Zusammensetzung der Matrix. Mechanische Belastungen verursachen eine Vielzahl von Veränderungen: Deformation der Chondrozyten und der Matrix, Flüssigkeitsströme und damit eine Verschiebung der Konzentration mobiler Ionen, Veränderungen im Wassergehalt der Matrix, Veränderungen des pH-Werts und des osmotischen Drucks beeinflussen den Metabolismus der Chondrozyten (Urban, 1994; Sah et al., 1989). Die empfangenen Signale steuern Synthese und Abbau der wichtigsten Moleküle: Kollagene und Proteoglykane. Während Kollagen II eine hohe Langlebigkeit aufweist (Steadman et al., 1997), sind die Proteoglykane einer höheren Umsatzrate unterworfen. Die großen aggregierten Proteoglykane haben nach Lai et al. (1991) eine mittlere Lebensdauer von etwas mehr als drei Jahren. Bei PG, die sich in der Nähe der Chondrozyten aufhalten, ist der Metabolismus intensiver (Mok et al., 1994).

Trotz der hohen metabolischen Aktivität der Chondrozyten und des hohen Organisationsgrades der Matrix besitzt Knorpel nicht die Fähigkeit zur vollen funktionellen Regeneration bei Verletzungen oder Krankheit (Buckwalter und Mankin, 1997b). Auch eine Kompensation von hohen Belastungen durch ein Dickenwachstum ist nicht zu erreichen (Eckstein et al., 2001). Eine tiefe Verletzung des Knorpels führt dazu, dass sich mechanisch

unstabiler, fibröser Knorpel bildet, der relativ schnell gebildet wird und hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht („*scarring*“). Dieser füllt den Defekt zwar aus, bewirkt aber keine dauerhafte Funktionalität mehr. Des weiteren führt dieser Bereich zu einer weiteren Degeneration des umliegenden Gewebes, so dass eine langsame Degradation des gesunden Knorpels stattfindet (Buckwalter und Mankin, 1997b, 1998).

1.2. Klinische Relevanz und Methoden der Reparierung

Im Gegensatz zu reinen Knochenbrüchen sind Schäden am Knorpel (z. B. durch Sportverletzungen, Unfall, Trauma o. ä.) nicht reversibel. Sie können von den Chondrozyten nicht behoben werden. Dies betrifft allein in den USA eine Zielgruppe von 1 Millionen Patienten pro Jahr (Blunk et al., 2002). Für sie wurden bereits etablierte klinische Methoden für die Behandlung von Knorpelschäden entwickelt. Dazu gehört ein Verfahren, das die Reparatur des Gewebes durch die Chondrozyten anregen soll, etwa durch Penetration des subchondralen Knochens. Dadurch füllt sich bei Defekten, die durch die gesamte Dicke des Knorpels reichen, die Lücke durch Einwanderung undifferenzierter mesenchymaler Zellen, die ihrerseits in kurzer Zeit fibröses Knorpelgewebe bilden, das jedoch, wegen des hohen Anteils an Kollagen Typ I wesentlich weniger belastbar ist als das umliegenden Gewebe (Buckwalter und Mankin, 1998). Dieses Ziel wird mit verschiedenen Techniken erreicht, z. B. durch Abrasionsarthroplastik (Bert und Maschka, 1989; Bert, 1997) oder Mikrofrakturen (Steadman et al., 1997).

Eine weitere, etablierte Methode ist die „Mosaikplastik“ oder osteochondrale Transplantation. Hierbei wird von einer unbeschädigten und möglichst selten beanspruchten Stelle der Gelenkoberfläche ein Stück Knorpel mit darunter liegendem Knochen entnommen und in den Defekt transplantiert (Autograft) oder von einem anderen Donor entnommen (Allograft). Durch das mosaikartige Einsetzen können auch größere Schäden behandelt werden (Beaver et al., 1992; Outerbridge et al., 1995)

Eine in jüngerer Zeit aufgekommene Methode, die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT), folgt einem anderen Ansatz. Hier wird aus einer unbelasteten Zone eine kleine Biopsie gesunden Knorpels entnommen. Die extrazelluläre Matrix wird enzymatisch aufgelöst und die Chondrozyten werden einige Passagen lang zu einer hohen Zellzahl vermehrt. Diese *in vitro* proliferierten Zellen werden dann unter einen Periostlappen gespritzt, der zuvor unmittelbar über den Defekt genäht wurde. So lokalisiert sollen die Zellen differenzieren und neuen Knorpel bilden (Breinan et al., 1998; Erggelet und Steinwachs, 1998).

Bisher ist jedoch für keine der existierenden Prozeduren zur Reparatur oder Transplantation nachgewiesen worden, dass sich so normales Knorpelgewebe wiederherstellen lässt.

Lediglich die Linderung von Symptomen und eine suboptimale Funktionalität des Knorpels kann auf diese Art erreicht werden. Das Ziel, intaktes, voll funktionsfähiges Knorpelgewebe in geschädigten Gelenkoberflächenarealen wiederherzustellen, ist damit noch nicht erreicht (Buckwalter und Mankin, 1998). In neuester Zeit stehen mit dem Ansatz des *Tissue-engineering*, also der künstlichen Gewebeherstellung *in vitro*, weitere Möglichkeiten zur Verfügung, um dieses Ziel zu erreichen.

1.3. Darstellung der Komplexität der Knorpelneubildung

Die Komplexität der Regulation und des Metabolismus des nativen Knorpels stellt hohe Ansprüche an eine Methode, die *in vitro* eine Chondroneogenese (Knorpelneubildung) erreichen soll. Aus diesem Grund müssen zunächst die auftretenden Mechanismen bei einer *in vitro* Kultivierung definiert werden.

1.3.1. Dedifferenzierung

Chondrozyten, die auf Plastikoberflächen proliferiert werden, ändern ihren Phänotyp. Während sie im nativen Knorpel eine runde Form zeigen, wachsen sie auf Plastikoberflächen in spindelförmiger, fibroblastenähnlicher Gestalt. Des Weiteren bilden sie mit zunehmender Passagierung immer weniger Kollagen II aus, die Bildung von Kollagen I überwiegt. Diese Änderung der phänotypischen Ausprägung ist sehr gut dokumentiert (Watt, 1988; Bonaventure et al., 1994; Holtzer et al., 1960; Mayne et al., 1976; Benya und Shaffer, 1982). Wie weit dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Prozess auf molekularer Ebene reicht, ist jedoch umstritten. Eine Abhängigkeit von der Wahl des untersuchten Modells kann nicht ausgeschlossen werden. Einhergehend mit den phänotypischen wurden umfangreiche biochemische Änderungen beobachtet: Die Synthese der knorpelspezifischen Kollagene II, IX und XI wird eingestellt, stattdessen werden die interstitiellen Kollagene (Typ I, III und V) gebildet, außerdem wird die Proteoglykansynthese von Aggrecan reduziert, stattdessen wird mehr Versican synthetisiert (Yaeger et al., 1997; Häuselmann et al., 1994; Elima und Vuorio, 1989; Bonaventure et al., 1994; Holtzer et al., 1960; Kuettner et al., 1982; Mayne et al., 1976; Benya und Shaffer, 1982). Stokes et al. (2002) konnten bereits nach 11 Tagen eine deutliche Abnahme der Kollagen II-Synthese und eine ebenso deutliche Zunahme der Kollagen I-Synthese nachweisen. Über Microarray-Studien konnten sie deutliche Unterschiede in der Genexpression zwischen differenzierten und dedifferenzierten Chondrozyten feststellen. Unter anderem war die Expression von Kollagen IX und XI, Aggrecan, Chondroitinsulfat-Proteoglykan 3, SOX9, IGF-2 und BMP-6 in den dedifferenzierten Zellen bis zu 11-fach schwächer ausgebildet als in differenzierten

Chondrozyten. Benz et al. (2002) zeigten anhand von Microarray-Analysen eine Abregulierung von Kollagen II, Fibromodulin, Aggrecan und anderer Marker. Im Gegensatz dazu berichten Kolettas et al. (1995) davon, dass sich Chondrozyten unter besonderen Bedingungen einer Langzeitkultivierung über bis zu 37 Passagen ohne wesentliche Änderungen der Genexpression subkultivieren lassen.
Umstritten ist ausserdem, ab wann von dedifferenzierten Zellen gesprochen wird, und ob eine Dedifferenzierung reversibel ist.

1.3.2. Chondrogenese

Der Begriff Chondrogenese kann in zweierlei Sicht benutzt werden. *Sensu strictu* ist er über die Vorgänge definiert, die während der Embryonalentwicklung dazu führen, dass sich Knorpel bildet. Diese beinhalten unter anderem die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten. Diese Ereignisse werden in jüngster Zeit auch in *in vitro* Systemen untersucht (Sekiya et al., 2002). Andererseits wird der Begriff auch beim *Tissue Engineering* benutzt, um die Knorpelbildung zu benennen. Für das *in vitro*-System ist es daher vorteilhaft, zur Abgrenzung von Chondroneogenese zu sprechen.
Der Vorgang der Knorpelneubildung in der Zellkultur ist unphysiologisch, da er in nativem Knorpel nicht vorkommt (vgl. Kapitel 1.2). In diesem System dient die Ausbildung von direkten Zell-Zell-Kontakten als Signal für deren Beginn.
Definitionsgemäß beschreibt die Chondroneogenese die Ausprägung knorpelspezifischer Marker und Proteine (vor allem Kollagen Typ II und GAG), sowie die Ausprägung eines phänotypisch knorpelähnlichen Gewebes. In dieser Arbeit wurde daher hauptsächlich die Analyse von GAG und Kollagen II, sowie die makroskopische und histologische Ansicht der Gewebepellets als Marker für eine erfolgte Chondroneogenese herangezogen.

1.3.3. Redifferenzierung

In jüngerer Zeit wird für Belange des Tissue Engineering eine (Re-)Differenzierungsphase gefordert, die es den Zellen erlaubt, die Proliferation abzuschalten, bevor sie in die Gewebeneubildung eintreten (Strehl et al., 2002). In bisherigen Systemen werden die Zellen überwiegend zunächst proliferiert und dann wird übergangslos die Chondroneogenese stimuliert. Dieses Modell ist dann sinnvoll, wenn die Zellen während der Proliferation ihre Chondrogenesefähigkeit nicht verlieren. Dies ist streng genommen nur bei primären Chondrozyten der Fall. Man muss davon ausgehen, dass sich durch die bereits beschriebene Dedifferenzierung der Zellen während der *in vitro* Proliferation eine gemischte Zellpopulation unterschiedlich weit dedifferenzierter Zellen bildet. Ein Signal zur Chondroneogenese wird nur von dem nicht dedifferenzierten Teil der Population erfolgreich verarbeitet. Die Einführung einer zeitlich ausgedehnten Redifferenzierungsphase hätte den Vorteil, die Proliferation zu stoppen und den Zellen Gelegenheit zur Differenzierung bzw.

Wiedererlangung des differenzierten Status zu geben. Somit wäre die Zellpopulation auf einen einheitlichen Differenzierungsstatus synchronisiert, wodurch sie für die Stimulierung der Chondroneogenese durch Zell-Zell-Kontakt sensibel gemacht würde. Eine optimale Redifferenzierungsphase sollte dazu führen, dass sich die redifferenzierten Zellen wie primäre Chondrozyten verhalten.

Die Grundvoraussetzung für eine nachhaltige Redifferenzierungsphase besteht darin, dass die vorzeitige Bildung von Zell-Zell-Kontakten weitgehend verhindert wird. Um dieses Ziel zu erreichen, könnten verschiedene Methoden angewandt werden. Ein populäres Kultursystem ist das Einschließen der Zellen in Agarose (z. B. Shyy und Chien, 1997). Durch den Einschluss verbleiben die gebildeten extrazellulären Matrixproteine in der direkten Umgebung der Zellen, so dass im Laufe der Kultivierung eine Matrix entsteht, die der natürlich vorkommenden ähnelt (Bradding et al., 1992; Benya und Shaffer, 1982; Aydelotte et al., 1992). Nach Aussage verschiedener Autoren ist es in diesem System außerdem möglich, durch Proliferation dedifferenzierte Chondrozyten wieder zu redifferenzieren (Aulthouse et al., 1989; Benya und Shaffer, 1982; Aydelotte et al., 1992). Ein besonderer Vorteil ist, dass die gebildete Matrix relativ leicht durch immunhistochemische Methoden charakterisiert werden kann. Eine präparative Nutzung der Zellen nach der Kultur in Agarose ist jedoch bisher noch nicht versucht worden.

Dies wäre mit einer alternativen Methode möglich. Sie besteht darin, Zellen in Alginat einzubetten und dort zu kultivieren (Kupchik et al., 1983). Alginat ist ein lineares Copolymer -(β-D-Mannuronsäure – α-L-Guluronsäure)$_n$ -, das aus Braunalgen gewonnen wird und in Gegenwart von Calcium oder anderen bivalenten Kationen geliert (Guo et al., 1989). Durch die Zugabe von Citrat als Chelat wird das Calcium komplexiert, und das Gel depolymerisiert. Dadurch ist es möglich, die darin enthaltenen Zellen und die gebildete Matrix ohne großen Aufwand zu analysieren und weiter zu verarbeiten. Die Kultur in Alginat ist vorteilhaft, da, ähnlich wie in Agarose, kaum Zellkontakte bestehen, die Zellen eine runde Morphologie behalten und um sich herum Matrix bilden können. Diese wird in den Poren des Alginatgels in der Nachbarschaft der Zellen zurückgehalten. Man unterscheidet zwei Kompartimente: die zell-assoziierte (CM) und die interterritoriale Matrix („*further removed matrix*“ FRM), die sich weiter von den Zellen entfernt bildet (Häuselmann et al., 1994; Petit et al., 1996; Chubinskaya et al., 2001; Mok et al., 1994).

Diese Kulturmethode ermöglicht es, Chondrozyten für lange Zeit phänotypisch stabil zu halten. Häuselmann et al. (1994) kultivierten Rinderchondrozyten bis zu 8 Monate lang in Alginat, ohne dass diese ihren Phänotyp verloren. Auch die gebildete Matrix in den Alginatbeads ähnelt der natürlichen (Häuselmann et al., 1994; Petit et al., 1996; Häuselmann et al., 1996). Bei primären humanen Chondrozyten wird berichtet, dass eine Kultivierung in Alginat bereits nach 7 Tagen zu einer naturnahen Matrixbildung führt (Schulze et al., 2000).

Des weiteren konnte festgestellt werden, dass sie sich in Alginatkultur problemlos 8 Monate kultivieren lassen, ohne dass sie dedifferenzieren (Chubinskaya et al., 2001). Die Eignung als reines Kultursystem für humane Chondrozyten erscheint daher als sehr vielversprechend.

Der Einsatz als Redifferenzierungssystem wurde bereits beschrieben. Bonaventure et al. (1994) zeigten für einmal passagierte Zellen eine Redifferenzierung in Alginat, belegt an Markern für Kollagen II, IX und X. Auch für Rinderchondrozyten wurde eine Redifferenzierung bei 5 % Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen (Domm et al., 2000).

Eine einheitliche Methode für die Messung von Redifferenzierung ist bisher nicht etabliert. Diese kann entweder über molekularbiologische Methoden (Expression der knorpelspezifischen Gene), durch phänotypische Charakterisierung (Morphologie der Zellen und der gebildeten Matrix) oder durch eine Kombination aus beidem erreicht werden. Des weiteren ist es schwierig, die Redifferenzierung in in vitro-Systemen strikt von Proliferation und Chondroneogenese zu trennen. Auch durch die beschriebene Bildung unterschiedlich differenzierter Subpopulationen treten Probleme auf. Daher wurden in den meisten Fällen intensiv passagierte Zellen (Passage 6 bis 9) für die Charakterisierung der Redifferenzierung herangezogen. Bei diesen kann bereits von einer deutlichen Dedifferenzierung während der Proliferation ausgegangen werden (vgl. Kap. 1.3.1), eine Erhöhung der Chondrogenesfähigkeit solcher Chondrozyten kann daher relativ sicher auf eine Redifferenzierung zurückgeführt werden.

Zur Untersuchung der Redifferenzierung wurden zum Einen phänotypische Merkmale, zum Anderen molekulare Marker (in diesem Fall GAG und Kollagen) bestimmt. Eine Erhöhung der Chondrogenesefähigkeit durch die Redifferenzierung sollte durch Vergleich mit dem 2-Phasen-System nachgewiesen werden.

1.3.4. (Re-)Differenzierungsignale

Die Einführung einer separaten Phase zur Redifferenzierung eröffnet weitere Möglichkeiten zu deren Stimulierung durch Applikation gezielter Differenzierungssignale. Ein möglicher Kandidat für solche Signale ist die Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks.

Die These, dass der Sauerstoffpartialdruck als Differenzierungssignal dient, wurde bereits von Brighton & Heppenstall (1971) postuliert, die bei der Epiphysenplatte feststellten, dass der Sauerstoffgehalt sich sehr stark auf das Wachstum sowohl von Knochen, wie auch Knorpel auswirkt, und dass in den unterschiedlichen Gewebetypen *in vivo* ein Sauerstoffgradient vorliegt. Postuliert wird, dass der Partialdruck ein physiologischer Kontrollmechanismus ist, der während der Skelettentwicklung das Wachstum und die Differenzierung von Knochen und Knorpel überwacht und dass bestimmte Konzentrationsbereiche gewebetypisch sind. Auch eine chondrogene Differenzierung

mesenchymaler Stammzellen durch Reduktion auf 8 % O_2 in der Gasphase konnte bereits nachgewiesen werden (Robinson et al., 1993).

1.3.5. spezifische Faktorenwirkung in unterschiedlichen Aktivitätsphasen

Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf humane Chondrozyten ist ein aktuelles Thema der Forschung. Meist wird der Einfluss auf bestimmte Phasen der *in vitro*-Kultivierung (z. B. Proliferation oder Chondroneogenese) untersucht. Dabei wurde mit dem Kompetenzprinzip ein wichtiger neuer Aspekt der Wirkung von Wachstumsfaktoren entdeckt. Bestimmte Signale sind geeignet, die Chondrozyten zu veranlassen, die G_0-Phase, in der das Wachstum gestoppt ist, zu verlassen und in die S-Phase (Synthesephase) eintreten zu können (Stiles et al., 1979; Hardingham et al., 1992). Gleichzeitig induzieren und stimulieren sie die Rezipienz der Zellen für andere Faktoren (Stiles et al., 1979; Kato et al., 1983). BFGF, IGF-I und PDGF-BB gehören zu diesen sogenannten Kompetenzfaktoren. Für Ansätze des Tissue Engineering sind diese Faktoren deshalb bedeutsam, da sie sozusagen als „Weichensteller“ für die weitere Entwicklung der Chondrozyten fungieren, und damit die Ergebnisse in hohem Maße beeinflussen können.

Ein weiterer Aspekt ist die Multifunktionalität von Faktoren. Diese tritt bei TGF-β besonders deutlich hervor. Die Wirkung von TGF ist sehr gut untersucht. Je nach Bedingung führt sie zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Eine mitogene Wirkung von TGF während der Proliferation wurde mehrfach nachgewiesen (Guerne et al., 1995; Horton jr. et al., 1989), deren Ausmass das der Wirkung von bFGF übertraf. Vivien et al. (1990) zeigten beides, eine proliferationsfördernde und eine hemmende Wirkung. Auch für den Einfluss auf die Proteoglykansynthese gibt es Berichte über fördernde (Afoke et al., 1987) und hemmende Wirkung von TGF (van der Kraan et al., 1992).

Diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass sich TGF-β unterschiedlich auswirkt, je nachdem, in welchem Zustand sich die Zellen befinden. Ein proliferativer Effekt von TGF auf Chondrozyten konnte nachgewiesen werden, wenn sich die Mehrzahl der Zellen in der S-Phase befanden. Eine hemmende Wirkung wurde dann beobachtet, wenn sich der überwiegende Teil der Zellen in der G_1-Phase befand (Vivien et al., 1992; Vivien et al., 1993). Die Wirkung von TGF-β hängt also stark vom Differenzierungsgrad und der Kondition der Zellen ab. Die Multifunktionalität ist relevant für Ansätze des Tissue-Engineering, da hier häufig mit gemischten, unterschiedlich weit differenzierten Zellpopulationen umgegangen wird.

In dieser Arbeit wurden daher die Einflüsse bzw. Wirkungen dieser Wachstumsfaktoren (bFGF, IGF-I, PDGF-BB und TGF-β_1) in den verschiedenen Phasen untersucht. Des weiteren wurde Interleukin-4 einbezogen. Dieser Faktor wurde ausgewählt, da er im Knorpel

z. B. bei rheumatoider Arthritis antiinflammatorisch wirkt (Isomäki und Punnonen, 1997), außerdem zeigt er eine chondroprotektive Wirkung. Ein Abbau der Matrix von Explantaten aus dem Rind, durch Interleukin-1 und TNF-α (*tumor necrosis factor*) hervorgerufen, konnte durch die Zugabe von IL-4 wesentlich reduziert werden (Yeh et al., 1995). Salter et al. (1996) wiesen durch immunhistochemische Untersuchungen bei humanem Knorpel nach, dass die Chondrozyten dieses Zytokin bilden, vor allem in den tiefen und mittleren Schichten des Knorpels. In den oberen Schichten waren in gesundem Knorpel nur wenige Zellen positiv, in osteoarthritischem Knorpel dagegen genauso viele wie in den unteren Schichten.

1.4. Chancen des Tissue-Engineering

Die rekombinante Technik der Herstellung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, sowie die technischen Möglichkeiten zur automatisierten Kultivierung von Geweben und die Applikation mechanischer Belastungen im Bioreaktor zum Zweck des Zelltrainings hat in jüngster Zeit eine Vielzahl neuer technischer Ansätze eröffnet. Aufgrund der mannigfaltigen Arten von Trägermaterialien, Bioreaktoren und der Vielzahl der eingesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokine wird hier darauf verzichtet, einen Überblick über alle Ansätze zu geben.

Einige grundlegende Probleme sind jedoch bei Strehl et al. (2002) dargestellt. Die Mehrzahl der Ansätze, Knorpelschäden unter Einsatz des *Tissue Engineering* zu therapieren, leiden unter einem Hauptproblem. Sie schliessen einen Schritt zur *in vitro* Vermehrung aus Patientengeweben isolierter Zellen ein, obwohl noch keine Kulturbedingungen bekannt sind, die erlauben, den differenzierten Phänotyp der frisch isolierten Chondrozyten während der Proliferation zu erhalten oder alternativ zu ermöglichen, dessen Verlust wieder rückgängig zu machen.

Die aktuellsten Ansätze zum Tissue Engineering sollen hier kurz beschrieben werden. Der erste und bereits in der klinischen Anwendung befindliche Ansatz ist die oben beschriebene ACT. Diese Methode ist daraufhin konzipiert, dass die Chondrozyten *in vitro* zu einer hohen Zellzahl proliferieren und darauf folgend in das Gelenk zurück überführt werden (Ein-Phasen-System). Die Kritik an diesem Ansatzes besteht darin, dass zum Einen eine Dedifferenzierung durch die Proliferation der Chondrozyten auftritt, und zum Anderen, dass das Einspritzen von Zellen in den Defekt die *scarring*-Reaktion nicht verhindert, bzw. ähnliche Effekte wie das Einwandern mesenchymaler Stammzellen zur Folge hat. Besonders nachteilig ist, dass die Reaktionen im Defekt nachträglich nicht zu steuern sind.

Aufgrund dieser Unwägbarkeiten fand eine Weiterentwicklung dieser Methode statt, die die beiden Hauptprobleme lösen soll. Bei der sogenanten Matrixassoziierten ACT (MACT) werden die Chondrozyten aus der Biopsie nicht proliferiert. Nach der enzymatischen Verdauung der ECM werden die primären Zellen in dreidimensionale Konstrukten

eingebettet, z. B. Vliese aus PGA oder PLLA (Sittinger et al., 1996; Perka et al., 2000), Kollagen Typ I- oder Fibringele). Diese werden dann unter einen Periostlappen in den Defekt eingesetzt. Durch diesen Ansatz wird die Dedifferenzierung durch die Passagierung vermieden. Eine Steuerung der Defektheilung ist jedoch weiterhin nicht möglich.

Gegenstand intensiver Forschung ist auch die *in vitro*-Kultivierung humanen Knorpels in einem 2-Phasen-System, in dem die Chondrozyen zunächst proliferiert und danach als dreidimensionale Pellets (meist als *high-density*-Kulturen) Knorpel bilden sollen. In high-density-Kulturen (HD-Kulturen) werden Zell-Zell-Kontakte hergestellt, die ein Signal für die Chondroneogenese darstellen.

Die Variationen in diesem System sind groß. Alternativ zu HD-Kulturen werden vor allem dreidimensionale Konstrukte (Vliese, Gele) favorisiert, die allerdings die Signalwirkung der Zell-Zell-Kontakte behindern, da eine gleichmäßige Verteilung der Chondrozyten die Kontakte der Zellen untereinander minimiert. An diesem Modell ist vorteilhaft, dass sowohl die Proliferation, wie auch die Chondroneogenese der Zellen gezielt stimuliert werden kann.

Ein besonderer Vorteil des 2-Phasen-Systems ist, dass sich der Grad der Chondrogenesefähigkeit der Zellen direkt abbilden lässt (Schulze-Tanzil et al., 2002). Daher kann auch konstatiert werden, dass nur ein Teil der Gesamtzellpopulation so weit differenziert ist, dass sie die Chondrogenese unterstützen. Ein Teil der anderen Zellen proliferiert oder erleidet die Apoptose. Daraus lässt sich ein weiteres Problem ableiten: Da die Chondrozyten in Gewebekultur ihren Metabolismus über parakrine Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren weitgehend selbst regulieren, erhalten sie widersprüchliche Informationen. Dies führt notwendigerweise zu einer Verringerung der Gesamtchondrogeneseleistung. Bei wenig passagierten oder primären Zellen, die sich auf einem einheitlichen Differenzierungsniveau befinden, kann die HD-Kultur ohne diese Probleme angewendet werden. Nach intensiver Passagierung ist mit diesem System eine Redifferenzierung jedoch kaum zu erreichen.

1.5. Besondere Probleme mit humanen Chondrozytenkulturen

Untersuchungen am Knorpel werden meistens in Tiermodellen durchgeführt, vor allem beim Rind (z. B. Domm et al., 2000; Yeh et al. 1995), Kaninchen (Jones & Addison, 1975; Vivien et al., 1990) und Huhn (Chen et al., 1992; Mayne et al.,1976). Im Rahmen des Projektes, in dem diese Arbeit entstand, wurde auch eine Studie am Schwein als Tiermodell durchgeführt. Im Zuge der z. T. parallelen Untersuchungen stellte sich schon früh heraus, dass die beim Schwein gewonnenen Ergebnisse in den meisten Fällen nicht auf humane Chondrozyten übertragbar waren.

Eine wichtige Abgrenzung des humanen zu tierischen Systemen wird durch den aufrechten Gang des Menschen begründet. Die andere Lastverteilung führt bei humanem

Gelenkknorpel *in situ* zu wesentlich höheren Belastungen, als dies bei Vierbeinern der Fall ist. Diese Unterschiede werden z. B. in der Dicke des Knorpels deutlich. Während beim Schwein die Dicke des hyalinen Kniegelenkknorpels bei etwa einem Millimeter liegt (eigene Daten), erreicht er im menschlichen Kniegelenk in Zonen grosser Belastung eine Dicke von bis zu 5 mm (Eckstein et al., 2001). Da gerade die Belastung starke Auswirkungen auf den Knorpelmetabolismus ausübt (vgl. Kap. 1.1.3), ist dieser Unterschied besonders zu berücksichtigen. Auch strukturell bestehen Unterschiede und vor allem die zunehmende Instabilität des Knorpels mit steigendem Alter (Muldrew, 2002; Wells et al., 2003) ist von grosser Bedeutung.
Daher können Ergebnisse, die an Tiermodellen erhalten wurden, nicht ohne weiteres auf das humane System übertragen werden.

1.6. Fragestellungen der Arbeit

Viele Argumente sprechen für den Ansatz, Methoden des Tissue Engineering zur nachhaltigen Therapie von Gelenkflächenschäden einzusetzen. Zur Zeit scheinen die Voraussetzungen dafür allerdings noch nicht in ausreichendem Maße erfüllt zu sein. So ist gerade die Steuerung der Knorpelbildung beim Menschen noch nicht so weit verstanden, dass es gelingt, dieses nur von einem Zelltyp generierte Gewebe *in vitro* in voller Funktionalität nachzubauen. Wie in der einleitenden Zusammenfassung dargestellt resultiert ein wesentlicher Teil der Probleme aus der Notwendigkeit, eine ausreichende Anzahl kompetenter Zellen durch *in vitro* Vermehrung adulter autologer Chondrozyten des Patienten zu generieren. So konzentrieren sich die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen im wesentlichen auf die Lösung des Problems, den mit der notwendigen Zellexpansion einhergehenden Verlust des ursprünglichen Chondrogenesepotentials durch geeignete Gegenmaßnahmen zu kompensieren.
Im konkreten Fall sollte die Frage beantwortet werden, ob sich dieses Ziel durch Einführung einer begrenzten Phase zur Redifferenzierung der Zellen im Anschluss an die Proliferationsphase und zeitlich vor der eigentlichen Synthesephase der Knorpelkomponenten lösen lässt. Zu diesem Zweck wurde das Ziel verfolgt, rekombinante Wachstumsfaktoren zur Steuerung der einzelnen Phasen einzusetzen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Gewinnung und Isolierung der Chondrozyten

1. Schweinechondrozyten

Zur Gewinnung von Schweinechondrozyten wurden subadulte Minipigs getötet. Aus den Knien der Tiere wurde der Knorpel maximal 2 Stunden nach dem Tod abgeschält und in PBS (*Phosphate buffered saline*, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) überführt. Die abgeschälten Knorpelstücke wurden gewaschen, von Blut- und Geweberesten befreit und in einer Petrischale mit Skalpellen zerkleinert. Die Knorpelstückchen wurden in eine Verdauungskammer auf ein Sieb überführt und mit 50 ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) unter Rühren 25 Minuten bei 37°C im Brutschrank (Cytoperm 2 CO_2/O_2-Inkubator, Heraeus Instruments GmbH, Hanua, Deutschland) inkubiert. Die durchgetropfte Lösung wurde verworfen. Nach Zugabe von 50 ml Trypsin / EDTA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) fand eine zweite Inkubation (45 Min., 37°C, unter Rühren) statt, die durchgetropfte Lösung wurde wiederum verworfen. Nach 5-minütigem Waschen mit 50 ml DMEM (*Dulbecco´s modified eagle medium,* Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) wurden 50 ml Collagenase (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) zugegeben und eine weitere Inkubation (120 Minuten, 37°, unter Rühren) fand statt. Die durchgetropfte Lösung wurde gesammelt und 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert (Zentrifuge: Hettich Rotanta/TRC, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Die erhaltenen Zellen wurden nach Zellzählung (s. u.) in einer Dichte von etwa 1 * 10^4 Zellen/cm^2 in T-75-Flaschen (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät.

Nach diesem Schritt fand eine weitere, 120-minütige Inkubation mit Collagenase statt. Die Lösung wurde ebenfalls gesammelt, abzentrifugiert und die Zellen ausgesät.

Um eine möglichst große Ausbeute an Chondrozyten zu erreichen, wurde der Rest des Knorpels mit Collagenase über Nacht bei 37°C inkubiert. Auch hier wurde die Lösung abzentrifugiert und die restlichen Zellen ausgesät.

2. Humane Chondrozyten

Humane Chondrozyten wurden aus zwei unterschiedlichen Quellen gewonnen. Zum Ersten fand eine Isolierung aus Knorpel statt, der bei verschiedenen Operationen entnommen wurde, zum anderen wurde der Knorpel von der Gerichtsmedizin zur Verfügung gestellt

(maximal 24 Stunden nach Eintreten des Todes). Das Protokoll für die Isolierung entspricht dem für Schweineknorpel bis zur ersten Collagenasebehandlung. Nach dieser wurde mit 50 ml Hyaluronidase unter Rühren bei 37° für 25 Minuten inkubiert. Die zweite Inkubation mit 50 ml Collagenase fand aufgrund der größeren Härte menschlichen Knorpels für 12 Stunden statt. Nach dieser Behandlung wurde erneut 24 Stunden inkubiert (25 ml Collagenase + 25 ml Hyaluronidase). Wie beim Schweineknorpel wurden die erhaltenen Zellen gezählt und ausgesät.

2.1.2. Gewinnung von Humanserum

Das benutzte Humanserum stammte aus Blut von verschiedenen freiwilligen Spendern, das vom Bluttransfusionsdienst zur Verfügung gestellt wurde. Das Blut aus dem Konservenbeutel wurde nach Abschneiden des Schlauches in Falcon-Röhrchen (Becton-Dickinson Labware, Franklin Lake, NJ, USA), die mit dem Aluminium-Silicat aus 5 Serum-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland) je Falcon gefüllt waren, überführt. Dabei wurden je 30 bis 45 ml Blut pro Röhrchen eingefüllt. Die Falcons wurden dann bei 4500 U/Min 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Serum erneut 10 Minuten bei 4500 U/Min zentrifugiert. Nach erneuter Dekantierung des Überstands wurde das Serum aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.1.3. Zellpräparationen

Nach der Gewinnung von humanen Chondrozyten sollten diese für einen längeren Zeitraum für Versuche zur Verfügung stehen. Je nach Menge des erhaltenen Materials konnten aus dem Knorpel bis zu 5 x 10^6 Zellen gewonnen werden. Um diese für mehrere aufeinander folgende Versuche nutzen zu können, wurden sie in den ersten Passagen sehr stark expandiert und dann eingefroren. Zum Einfrieren wurden jeweils 5*10^6 Chondrozyten in 1 ml DMEM, supplementiert mit 20 % FKS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) resuspendiert, in Cryo-vials (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und in einem gleichmäßig abkühlenden Propanolgefäß (1°C / Stunde; Qualifreeze, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) bis auf -70°C runtergekühlt. Nach dem Ende der Kühlphase wurden sie bei -70°C gelagert. Bei Bedarf an frischen Zellen wurden die Cryo-vials im Wasserbad schnell auf 37°C erwärmt und die Zellen gleich ausgesät.
Die für die Versuche benutzten Zellen stammten von den in Tabelle 1 angegebenen Donoren.

Tabelle 1: Herkunft der Chondrozyten.

Spender Zelllinie	Alter (Jahre)	Geschlecht	Ort der Entnahme	Herkunft
hCh 5	82	w	Knie	Klinik
hCh 8	6	m	Knie	Pathologie
hCh 9	37	w	Knie	Pathologie
hCh F1	36	w	Knie	Klinik

2.1.4. Zellzählung

Eine Zählung von Zellen oder Chondronen wurde mit einem Casy 1-Zellzähler (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) vorgenommen. Dieses Gerät misst nach dem Widerstandmessprinzip die Zellzahl und das Volumen der Zellen. Ein Ausdruck der Messwerte wurde für die Auswertungen herangezogen.

2.1.5. Proliferation und Passagierung

Die ausgesäten Zellen wurden in DMEM, supplementiert mit 10% FKS, 1% Penicillin / Streptomycin und 10 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF, Cell Concepts, Umkirch, Deutschland), bei 2 bis 3-tägigem Mediumwechsel bis zur Konfluenz proliferiert. Vor der Trypsinierung der Zellen von den Kulturflaschen wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Je nach Inhalt der Kulturflasche wurde 1/5 des Volumens an Trypsin / EDTA zugegeben (T-75-Flasche: 3 ml, T-175-Flasche: 5 ml [Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland]) und die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop (Olympus CK2, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) beobachtet. Durch Klopfen wurden die restlichen Zellen abgelöst und im Folgenden die Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Die Zellzahl in Suspension wurde bestimmt und diese bei 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Aufteilung der Zellen (Konzentration ca. $1*10^4$ Zellen/cm^2) wurden diese weiter proliferiert.

Für Versuche mit Schweinechondrozyten wurden im Allgemeinen Zellen der dritten oder vierten Passage benutzt.

Humane Chondrozyten wurden zusätzlich mit 10 ng/ml *Epidermal growth factor* (EGF, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland) supplementiert. Für Versuche wurden die Zellen bis in die dritte bzw. vierte Passage (Gruppe I), oder bis zur siebten / achten Passage (Gruppe II) proliferiert. Des Weiteren wurden die Zellen während der Proliferation mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen behandelt: 1. ohne Faktoren (Kontrolle), 2. mit 2 ng/ml *platelet derived growth factor* (PDGF-BB, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland), 3. mit 2 ng/ml PDGF-BB + 10 ng/ml bFGF.

2.1.6. Bedingungen zur Redifferenzierung der Chondrozyten

Chondrozyten leiden bei *in vitro* Kultivierung mit konventioneller Monlayertechnik unter einem Verlust der Chondrogenesefähigkeit (Dedifferenzierung, vgl. Kap. 1.3.1). Um die Zellen wieder in die Lage zu versetzen, Chondrogenese zu unterstützen, wurde versucht sie zu redifferenzieren. Zu diesem Zweck wurden sie in Alginat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) eingebettet.

Herstellung von „Alginat-Beads“

Nach der Trypsinierung der Zellen wurde eine Zellzählung durchgeführt und die Zellen bei 500*g (1500 U/min) 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden sie mit 1-fach Waschpuffer (150 mM NaCl + 25 mM HEPES (pH 7,4; 2-[4-(2-Hydoxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure [beides VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]) + a. dest ad 1000 ml) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 Minuten, 500*g) wurden die Zellen in gepuffertem Alginat suspendiert. Dieses bestand aus der Alginat-Stammlösung (2,4% Alginat in a. dest), die mit 2-fach-Waschpuffer (300 mM NaCl + 50 mM HEPES (pH 7,4) in a.dest) 1:1 angesetzt wurde, so dass die Alginatkonzentration 1,2% betrug. Die Suspension der Zellen in Alginat erfolgte bei einer Zelldichte von etwa 1 x 10^6 Zellen/ml. Die Zellen in Alginat wurden mittels einer selbst hergestellten Tropfvorrichtung in einen Kolben mit Calcium-Puffer (100 mM $CaCl_2$ [VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]+ 25 mM HEPES (pH 7,4) in a. dest.) getropft. Beim Eintropfen in den Calcium-Puffer polymerisiert Alginat, so dass sich sog. Alginat-„Beads“ bilden. Für die Aushärtung der „Beads“ wurde etwa 25 Minuten Zeit gelassen.

Redifferenzierung

Nach der Aushärtung wurden die Beads zweimal mit 1-fach Waschpuffer gewaschen und danach supplementiertes Medium zugegeben. Das Medium wurde bis zur Elution der Zellen, zwischen 2 und 4 Wochen nach Ansatz der Beads, alle zwei Tage gewechselt.

Im Laufe der Kultivierung der im Alginat eingebetteten Zellen bilden diese perizelluläre Matrix (PCM), bestehend aus Prokollagen und Glykosaminoglykanen (GAG), im Phasenkontrastmikroskop als charakteristischer Hof rund um die Zellen sichtbar. Diese wegen ihrer Ähnlichkeit mit Chondronen als Pseudochondrone bezeichneten Gebilde lassen sich aufgrund ihres Gehaltes an GAGs mit 1,9-Dimethyl-Methlenblau-Chlorid (DMMB; Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland) anfärben.

Isolierung und Weiterverarbeitung

Die Isolierungder gebildeten Pseudochondrone aus den Alginat-Beads erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden die Beads mit 1-fach Waschpuffer gewaschen. Dann wurde Citratpuffer (150 mM NaCl + 55 mM tri-Natriumcitrat [VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland] + 25 mM HEPES in a. dest., fünffaches Volumen der Beads) zugegeben und der Kolben unter Schütteln für 30-40 Minuten bei 37°C inkubiert, bis das Alginat vollständig

aufgelöst war. Nach der mikroskopischen Kontrolle wurden die Pseudochondrone 5 Minuten bei 220*g abzentrifugiert. Die Pseudochondronpellets wurden in 1-fach Waschpuffer resuspendiert und gezählt. Nach Entnahme der Anfangswerte wurden die Pseudochondrone erneut bei 220*g für 5 Minuten abzentrifugiert und je nach Versuch mit supplementiertem Medium resuspendiert und weiter verarbeitet.

2.1.7. Herstellung von Knorpelpellets

Je nach Herkunft bzw. Differenzierungsgrad der Zellen wurden unterschiedliche Protokolle angewandt.

1. **Pellets aus Zellen („direkte“ Chondrogenese, *high-density-pellets*)**

Die Verarbeitung von Zellen zu Pellets begann mit dem Waschen der Zellen in den Flaschen mit PBS und Trypsinierung. Nach Stoppen der Trypsinreaktion mit serumhaltigem Medium wurden die Zellen gezählt und abzentrifugiert. Die Resuspendierung der Zellen in supplementiertem DMEM erfolgte in unterschiedlichen Zellkonzentrationen (max. 3 Mio. Zellen/ml). Die Pellets wurden durch erneute Zentrifugation in 50 ml Falcon-Röhrchen in 3 ml Medium mit *insulin-like growth-factor I* (IGF-I, Cell Concepts, Umkirch, Deutschland), *transforming growth factor* β_1 (TGF-β_1, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland), 0,28 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) + 1 mM Cystein (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) (AsAP/C) und P/S bei 500*g für 5 Minuten hergestellt. Nach der Zentrifugation wurden sie zwei Tage in den Röhrchen stehengelassen und dann in agarosebeschichtete (Agarose von Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 12-well-plates (3 ml Medium pro well) umgebettet. Das Medium in den wells wurde alle zwei Tage bis zum Ende des Versuchs gewechselt.

2. **Pellets aus Chondronen**

Die humanen Chondrozyten wurden mit einer Vielzahl von Faktorenkombinationen und -konzentrationen getestet. Das Medium bestand in allen Fällen aus DMEM + 10 % Humanem Serum. Dem Medium wurden 1 % P/S und 1 % AsAP/C beigefügt.
Die Herstellung der Pellets fand ähnlich wie bei 1. statt. Die Zentrifugation erfolgte jedoch bei 500 U/min für 10 Minuten. Ansonsten wurden sie wie oben beschrieben behandelt.
Die zugegebenen Faktoren (z. B Interleukin-4 [IL-4, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland]) sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

3. Pellets auf Trägermaterialien, „indirekte“ Chondrogenese (*Switch*)

In verschiedenen Ansätzen wurden Zellen auf einem Träger zur Chondrogenese angeregt. Dazu wurden die Zellen auf das Trägermaterial aufzentrifugiert. Hierzu kamen spezielle, von der TU Hamburg-Harburg entwickelte Zentrifugenbecher und -einsätze zum Einsatz. In diesen befanden sich die jeweiligen Trägermaterialien (Calcibon® von Merck, Plättchen mit 6 mm Durchmesser). Die Chondrozyten wurden in je 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert und in die Einsätze pipettiert. Diese wurden bei 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden sie im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Aufgrund des geringen Mediumüberstands wurde nach 24 Stunden die Hälfte des Mediums gewechselt. Nach 48 Stunden wurden die Oberteile der Einsätze abgenommen und die Unterteile mit dem darin befindlichen Träger und Knorpel in agarosebeschichtete 12-well-plates (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Dort wurden sie mit 3 ml Proliferationsmedium überschichtet. Ein Mediumwechsel fand im Weiteren alle 2-3 Tage für zwei Wochen statt. Nach dieser Zeit wurde für weitere drei Wochen auf Chondrogenesemedium „umgeschaltet“ (*switch*) und die Zellen mit IGF-I und TGF-β_1 behandelt, um sie zur Chondrogenese anzuregen.

2.2. Analytik

2.2.1. DNA-Bestimmung

Die zu analysierenden Proben wurden zunächst zur Befreiung von Protein proteolytisch verdaut. Hierzu wurden sie in Papain-Lösung (500 µl 0,1M NaH_2PO_4/0,005M EDTA pH 6 + 5 µl Mercaptoethanol (alles VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) + 2,5 µl Papain-Lösung (10 mg/ml; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz) über Nacht im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter Schütteln bei 60°C behandelt. 50 µl der verdauten Probe wurde dann mit DNA-Verdünnungspuffer (2,5M NaCl / 19 mM Natriumcitrat pH 7) 1:5 verdünnt.

Die Messung des DNA-Gehalts erfolgte fluorometrisch in 96-well Mikrotiterplatten (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Jede Probe wurde doppelt bestimmt. In alle Zellen der Platte wurden 100 µl DNA-Ansatzpuffer (2M NaCl / 15 mM Natriumcitrat pH 7) vorgelegt. In die erste Zeile wurde in je zwei wells 100 µl der verdauten Probe gegeben und dann 1:2 in die darunter liegenden wells verdünnt. Für jede weitere Probe wurde ebenso vorgegangen. Nach Verdünnung aller Proben wurde in alle wells 100 µl Bisbenzimid-Lösung (2 ng/ml Bisbenzimid in DNA-Ansatzpuffer, Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg,

Deutschland) zugegeben. Die Platte wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.
Die Messung der Platten fand in einem computerunterstützen Photometer (Victor 1420 Multilabel counter, Wallac Distribution GmbH, Freiburg, Deutschland) statt. Die fluorometrische Messung beinhaltet eine Anregung bei 355 nm und die Extinktionsmessung bei 460 nm. Die Messwerte wurden in einer Excel-Datei ausgegeben und mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Excel-Macro; Adamietz) ausgewertet.
Als Standard diente eine 1:5 verdünnte Stammlösung (25 µg/ml Kalbsthymus DNA, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz).

2.2.2. GAG-Bestimmung

Zur GAG-Bestimmung wurden ebenso wie zur DANN-Bestimmung proteolytisch verdaute Proben eingesetzt. Die Messung erfolgte ebenfalls in 96-well Mikrotiterplatten. In alle wells wurden 100 µl a. dest. vorgelegt. In je zwei wells wurden 100 µl der verdauten Probe zugegeben und wie oben verdünnt. In alle wells wurden 150 µl 1,9-Dimethylmethylenblauchlorid-Lösung zugegeben und 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die Auswertung erfolgte wie bei der DNA-Bestimmung mittels einer Regressionsanalyse.
Als Standard wurde Chondroitinsulfat C (vom Hai, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) bei einer Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt.

2.2.3. Semiquantitative Kollagen-Bestimmung

Die Bestimmung des Kollagengehalts wurde mit Hilfe von Westernblots vorgenommen.
Knorpelpellets wurden zunächst in 500 µl Guanidinhydrochlorid (6 M in 0,2 M TRIS pH 8,5; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) 2 Stunden bei 60°C aufgelöst. Danach wurden 50 µl Dithioreitol (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland) zugegeben und 30 Minuten bei 60° inkubiert. Zu den reduzierten Proben wurden 50 µl 10 %ige Essigsäure (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 50 µl JAA-Lösung (0,1 M Jodacetamid [Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland] in DMSO) zugegeben. Bei Bedarf wurde die Probe bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Im nächsten Schritt wurde das Salz durch Dialyse von 100 µl der Probe in einer Stunde entfernt. Als Dialyselösung wurde eine Mischung aus 6 M Harnstoff (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland), 0,1 M PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid [F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz] in DMSO) und JAA-Lösung verwendet. Danach wurde das gesamte Probenvolumen entnommen und mit 10 µl Methylrot (2 % Methylrot in 0,6 % Essigsäure, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf 7,5% Acrylamid-Gelen in Gegenwart von Essigsäure und Harnstoff. Zur Herstellung der Trenngele (7,5 %) wurden 10 M Harnstoff (60 ml), a. dest. (17,5 ml), Eisessig (7 ml) und 50 % Acrylamidlösung (14 ml, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) entgast und zum Start der Polymerisation wurden 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS, 750 µl; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, 750 µl; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) zugegeben. Das Gel wurde mit 500 µl 0,6 % Essigsäure überschichtet und konnte eine Stunde polymerisieren. Danach wurde das Sammelgel (4 %) gegossen, das aus 31,6 ml Harnstoff, 13,4 ml a. dest., 300 µl Eisessig, 4 ml Acrylamid, 350 µl APS und 350 µl TEMED bestand und über Nacht polymerisierte. Die Gele wurden dann in der Elektrophoresekammer in 0,6 % Essigsäure bei 100 V eine Stunde gereinigt. In die ersten beiden Taschen wurden jeweils die Kollagen-Standards (Typ I und Typ II; Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) gegeben, in die folgenden je 10 µl der dialysierten Probe. An die Gele wurden 30 Minuten eine Spannung von 100 V und 150 Minuten von 200 V angelegt.
Das Blotting wurde in 0,6 % Essigsäure eine Stunde bei 80 V durchgeführt.
Zum Entwickeln wurde die Blotmembran zunächst 5 Minuten in PBS gewaschen und danach eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (0,5 % Casein [I-Block; Tropix, Bedford, CA, USA], 0,1 % Tween 20 [Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland] in PBS und 0,02 % Natriumazid [VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland]; in a. dest.) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht. Als primärer Antikörper wurde anti-Kollagen I bzw. anti-Kollagen II von der Ziege (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) genutzt. Nach der Inkubation wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer (0,2 % Casein, 0, 1 % Tween 20, 0,02 % Natriumazid) gewaschen und danach zwei Stunden mit dem sekundären Antikörper (Kaninchen-anti-Ziege IgG, biotinyliert, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschen in Waschpuffer (5 Min.) wurden die Gele 30 Minuten mit Alkalischer Phosphatase (AP, Streptavidin-markiert, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) bei RT behandelt. Danach erfolgten drei Waschschritte á 5 Minuten in Waschpuffer und zwei Waschschritte á 5 Minuten in Substratpuffer für AP (0,1 M Diethanolamin [Tropix, Bedford, CA, USA]/HCl, pH 10, 1 nM Magnesiumchlorid [VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland], 0,02 % Natriumazid). Darauf folgte eine Inkubation für 15 Minuten im Dunklen bei RT in Substratlösung für AP (66 µl p-Nitrotetrazolium-Blau (50 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in 70 % Dimethylformamid (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) + 33 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz (50 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) in 100% Dimethylformamid in Substratpuffer). Abschließend wurden die Blotmembranen zweimal fünf Minuten in a. dest gewaschen und getrocknet.

In einem typischen Westernblot waren die Bandenmuster sichtbar, die in Abbildung 2 dargestellt sind.

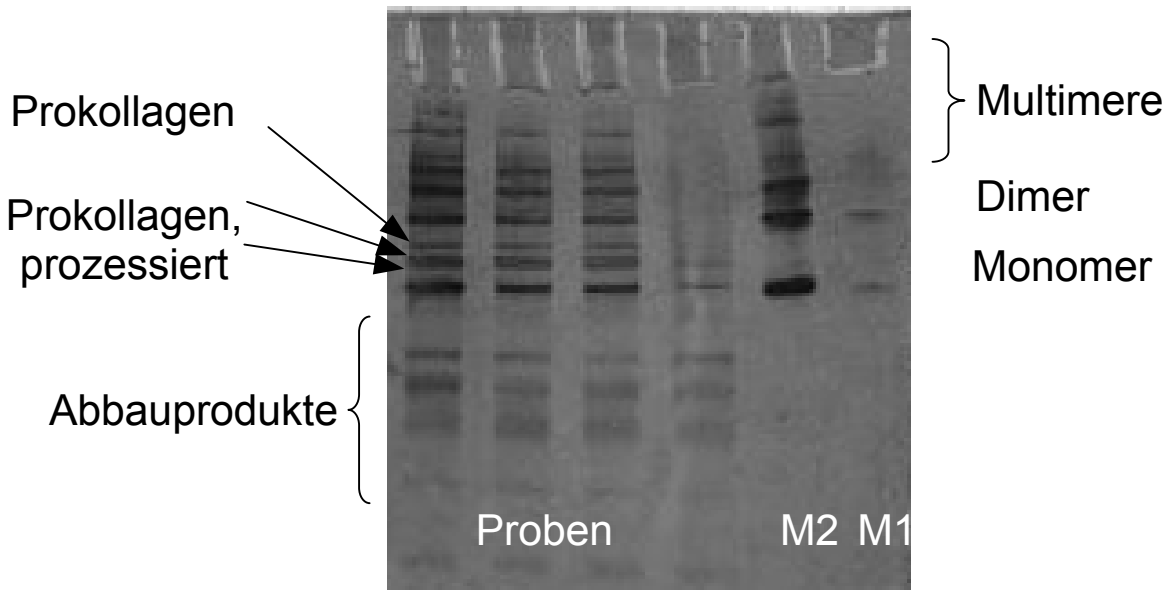


Abbildung 2: Typische Bandenmuster eines Kollagenblots. Der Marker für Kollagen II (M2) zeigte die Hauptbande beim Kollagen-Monomer, darüber befindliche Banden kennzeichnen Di- und Multimere. Prokollagen ist wegen seiner C- und N-terminalen Anhänge schwerer als das Kollagenmonomer. Die zugehörige Bande befindet sich daher etwas darüber. Dazwischen liegen die Banden des N- oder C-terminal prozessierten Prokollagens. Zur Kontrolle auf Kreuzreaktionen wurde der Kollagen Typ I-Marker (M1) mit aufgetragen.

2.2.4. Histologie

Eine histologische Aufbereitung der Pellets erforderte zunächst die Fixierung der Proben in 4 % PBS-gepuffertem Formalin (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Pellets, die auf Biomaterial gezüchtet wurden, mussten zusätzlich entkalkt werden. Dazu wurden sie in Ethylen-Diamin-Tetraacetat-Lösung (EDTA, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) solange inkubiert, bis die mikroskopische Kontrolle eine völlige Entkalkung zeigte.

Nach der Entkalkung wurde mit PBS gewaschen und eine Bouin-Fixierung (30 Minuten in Pikrinsäure/Formalin, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) vorgenommen. Zur Entwässerung wurden die Proben jeweils mindestens 15 Minuten in 80 %, 90 %, 96 % und zweimal in 100 % Ethanol (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden sie für mindestens 24 Stunden in Methylbenzoat (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt.

Die Einbettung in Paraffin erfolgte bei 62° in flüssigem Paraffin (Paraplast Plus, Sherwood Medical Co., Norfolk, NE, USA). Nach 24 Stunden wurde das Paraffin gewechselt und nochmals 24 Stunden bei 62° stehen gelassen. Danach wurden sie in mit Paraffin gefüllte Blöckchen überführt. Diese härteten im Kühlschrank aus.

Nach dem Schneiden (3 µm Schnittdicke, Mikrotom Histoslide 2000, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) wurden die Schnitte auf Objektträger (Histobond, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen und ein bis zwei Stunden oder über Nacht bei 60° fixiert.

Eine Färbung der gebildeten Matrix wurde mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung durchgeführt. Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol, je 2 Minuten) in aqua dest. überführt. Als nächster Schritt folgte die Färbung in Toluidinblau (45-60 Minuten, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Danach wurden die Schnitte dreimal mit a. dest. gewaschen und durch die aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 96 % jeweils nur kurz, 100 % 5 Minuten, 100 % nur kurz) in Xylol (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt (3x2 Minuten). Danach wurden sie mit Eukitt (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Die Immunhistologie für Kollagen I und II der Schnitte wurde mit Hilfe der APAAP-Methode (alkalische Phosphatase – anti-alkalische Phosphatase) durchgeführt. Die Schnitte wurden entparaffiniert (s.o.). Nach der aqua dest. Behandlung wurden die Objektträger 2 mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Demaskierung des Kollagens erfolgte mit Hilfe von Hyaluronidase (1 mg/ml in 0,1 M NaH_2PO_4, pH 5,5-5,6) in der feuchten Kammer, die vier Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Nach der Demaskierung wurde erneut zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 % Humanserum in PBS blockiert (Feuchte Kammer, 30 Minuten bei Raumtemperatur). Der primäre Antikörper (Anti-hCl I für Kollagen I, Anti-hCl II für Kollagen II; Medicorp, Montreal, Quebec, Kanada) wurde 1:100 mit *Dako Antibody diluent with background reducing components Nr. S3022* (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) verdünnt und auf den Schnitten über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Kontrolle wurde nur mit *Antibody diluent* behandelt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde drei mal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (*SBA Goat Anti Mouse* [Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA], 1:200 verdünnt in *Antibody diluent*) in der feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Ein erneutes dreimaliges Waschen für 5 Minuten in PBS folgte.

Das Färben der Schnitte wurde mit Alkalischer Phosphatase-Reagenz (Vectastain-Kit, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) nach Vorschrift durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei RT. Danach wurde zweimal mit TBS-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl (Tris/HCl) und NaCl in a.dest., pH 7,4-7,6; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Färbelösung angesetzt: pro Küvette wurden 4% Natriumnitrit (7,5 ml), Neufuchsin-Lösung (300 µl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland), 150 ml Tris/NaCl-Puffer (Tris/HCl und NaCl in a.dest, pH 8,24) und 750 µl Naphtol-AS-Bi-Phosphat-Lösung (Naphtol-AS-Bi-Phosphat [Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland] in Dimethylformamid) in dieser Reihenfolge gemischt und die Schnitte 30 Min. bei RT im dunklen inkubiert. Nach einem Waschen in Leitungswasser wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne (20-30 sek. in Hämalaun-Lösung (UKE, Hamburg, Deutschland), anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser bläuen) durchgeführt.
Zum Eindeckeln wurden die Schnitte feucht mit *Crystal Mount* (Biomeda Corp., Foster City, CA, USA) bedeckt, 5-10 Minuten bei 70°C auf der Heizplatte getrocknet und mit Clarion (Biomeda Corp., Foster City, CA, USA) eingedeckelt.

2.3. Auswertung und Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm SigmaStat durchgeführt. Der jeweilige Test ist bei den Ergebnissen angegeben.

2.3.1. Anzahl der Proben

Die Anzahl der angesetzten Proben variierte je nach Art des Versuches. Bei der Ermittlung von qualitativen Daten (z.B. Färbungen, Blots oder Histologien) wurden jeweils ein bis zwei Pellets analysiert. Bei allen eher quantitativen Aussagen (vor allem GAG- und DNA-Messungen) wurde versucht, die Anzahl der Proben möglichst hoch anzusetzen. Für diese Versuche wurde eine Mindestanzahl von drei Proben pro Messpunkt als Grundvoraussetzung für quantitative Aussagen festgelegt. Bei statistischen Aussagen mussten die Voraussetzungen für den jeweiligen Test, was die Mindestanzahl der Werte angeht, erfüllt werden.

2.3.2. GAG-Werte, DNA-Werte und G/D-Verhältnis

Zur Auswertung der biochemischen Daten wurden GAG und DNA-Werte wie oben angeben bestimmt. Die absoluten GAG-Werte konnten jedoch zwischen verschiedenen Versuchen nicht immer verglichen werden, da es Unterschiede in der Startzellzahl und der angewendeten Methode gab. Des Weiteren konnten auch innerhalb eines Versuches verschiedene DNA-Werte (d.h. unterschiedliche Zellzahlen) beobachtet werden. Daher wurde für den Vergleich und als Basis sicherer statistischer Auswertung das „G/D-Verhältnis" gebildet. Der Gehalt von GAG wurde durch den DNA-Gehalt geteilt. Die so entstandene, dimensionslose Messgröße gibt das Verhältnis von gebildeter Matrix zur Zellzahl an. Mit Hilfe dieses Verhältnisses war es möglich, verschiedene Versuche miteinander zu vergleichen.
Dieser Wert muss jedoch immer in Bezug auf den absoluten GAG-Gehalt gesehen werden.
Zur Interpretation der Ergebnisse wurden beide Werte nebeneinander analysiert, statistische Vergleiche wurden nur über das G/D-Verhältnis gezogen.

2.4. DNA-Eichkurve

2.4.1. Schweinechondrozyten

Die Bestimmung der Zellzahl in Knorpelproben fand indirekt über die Messung des DNA-Gehalts statt. Um ein Maß für die Exaktheit der Zellzahlbestimmung, und der daraus folgenden Ungenauigkeiten durch Verdünnung, zu erhalten, wurden experimentell ermittelte DNA-Anfangswerte mit einem aus Literaturwerten entnommenem DNA-Gehalt (Baserga, 1989) bei bestimmten Zellzahlen verglichen. Die statistische Aussage erfolgte über eine Regressionsanalyse.
Für die Eichkurve wurden Zellen der dritten Passage benutzt. Die Zellen wurden auf die jeweilige Zellzahl eingestellt (Tabelle 2), abzentrifugiert und sofort verdaut.
Die gemessenen Werte der Proben für die Eichkurve (R^2=0,941, p<0,001) unterschieden sich nicht signifikant (Mann-Whitney-Rank Sum Test, T=795, p=0,342) von den Erwartungswerten (Abbildung 3). Die Steigung der Regressionsgeraden über die gemessenen Werte war etwas größer als die der Erwartungswerte. Insgesamt wurden 24 Proben für die Regression ausgewertet (siehe Tabelle 2). Für die Schweinechondrozyten ergab sich aus der Regressionsgeraden ($y = -3{,}480 \cdot 10^{-8} + 6{,}154 \cdot 10^{-12} \cdot x$) eine DNA-Referenz von $6{,}15 * 10^{-12}$ g DNA/Zelle.

Tabelle 2: Zellzahl und Anzahl der genommenen Proben für die DNA-Eichkurve.

Zellzahl	250.000	500.000	1.000.000	2.000.000	3.000.000	4.000.000	6.000.000
Anzahl Proben	3	5	3	3	4	3	3

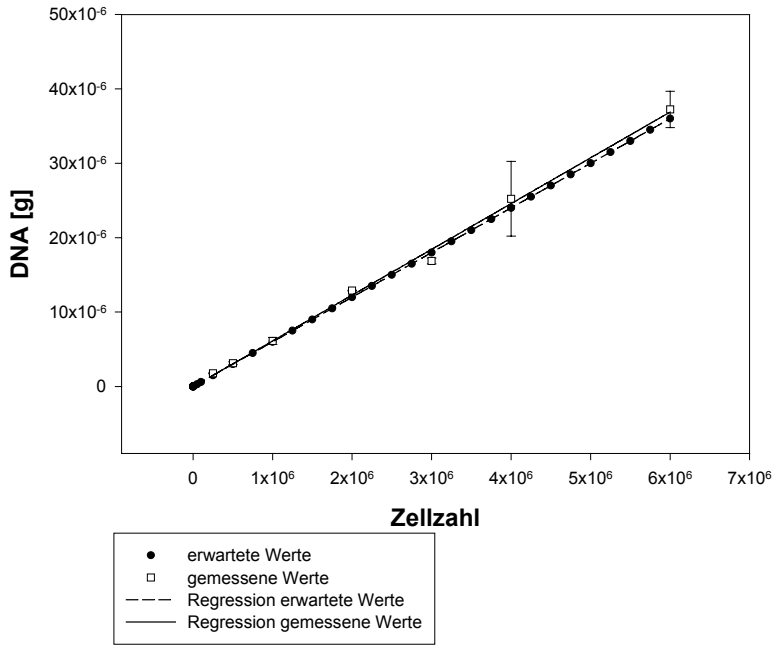


Abbildung 3: Vergleich der Regression der erwarteten mit der der gemessenen Werte. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung

2.4.2. Humane Chondrozyten

Aufgrund der Ergebnisse der DNA-Eichkurve für die Schweinechondrozyten wurde für die humanen Chondrozyten ebenfalls eine Eichkurve erstellt, die als Kontrolle der Anfangswerte und zur Bestimmung der Zellzahl in Proben humanen Knorpels herangezogen werden sollte.

Für die Eichkurve wurden Zellen der fünften Passage benutzt. Die Verarbeitung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Erstellung der DNA-Eichkurve der humanen Zellen wurden 47 Proben (Tabelle 3) ausgewertet. Die ermittelte Regressionsgerade ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Regression war signifikant (R^2=0,975, p<0,001). Die experimentell ermittelte Regressionsgerade ($y = -6,427 \cdot 10^{-8} + 1,007 \cdot 10^{-11} \cdot x$) ergab einen Wert von 1,007*10^{-11} g DNA pro Zelle. Dieser Wert wurde für die spätere Überprüfung von Zellzahlen herangezogen.

Tabelle 3: Zellzahl und Anzahl der Proben für die Eichkurve für humane Zellen

Zellzahl	$1,5*10^5$	$3*10^5$	$6*10^5$	$7,5*10^5$	$1*10^6$	$1,5*10^6$
Anzahl Proben	4	4	4	4	4	3
Zellzahl	$2*10^6$	$2,5*10^6$	$3*10^6$	$4*10^6$	$5*10^6$	$6*10^6$
	4	4	4	4	4	4

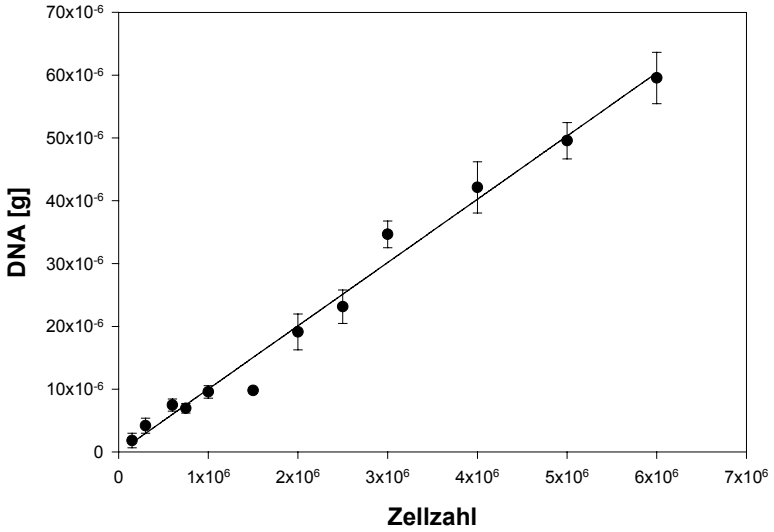


Abbildung 4: DNA-Eichkurve für die humanen Chondrozyten (aus gemessenen Werten). Die Regression (Rr=0,975) ist höchst signifikant (p<0,001). Bei jeder Zellzahl wurden vier Ansätze ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Zellzahl auf dem Träger (Calcibon)

Bei Versuchen, Zellen auf einem Hydroxylapatit-Träger (Calcibon) zu kultivieren, musste der Anteil bestimmt werden, der bei der Zentrifugation tatsächlich auf dessen Oberfläche sedimentierte. Dazu wurden unterschiedliche Zellzahlen von Schweinechondrozyten eingesetzt (Tabelle 4) und die Zellschichten nach Inkubation in Medium mit bFGF für 24 Stunden analysiert. Die aufzentrifugierten Zellen wurden proteolytisch behandelt und die Lysate wie unter Methoden beschrieben analysiert.

Tabelle 4: Zellzahl und Anzahl der genommenen Proben für die Bestimmung der Zellzahl auf dem Biozement.

Zellzahl	500.000	1.000.000	2.000.000	3.000.000	4.000.000	6.000.000
Anzahl Proben	6	6	6	3	3	3

Die Zellen wurden auf eine Gesamtoberfläche des Zentrifugeneinsatzes von 201,062 mm^2 (Durchmesser: 8 mm) zentrifugiert. Aufgrund des Flächenanteils des Trägers von 113,097 mm^2 (Durchmesser: 6 mm, entspricht 56,25%) wurde auch ein entprechender von Zellen auf dem Träger erwartet.

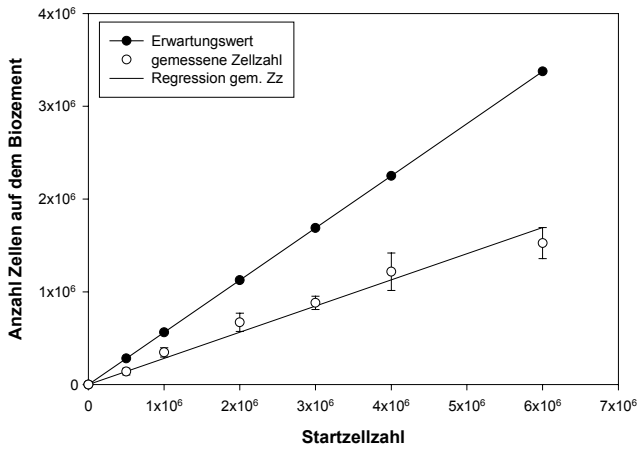


Abbildung 5: Vergleich der erwarteten und gemessenen Werte nach Zentrifugation auf den Biozement. Die erwarteten Werte leiten sich aus dem Flächenanteil des Trägerplättchens an der Gesamtoberfläche (siehe Text) ab.

In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die Regressionsgerade der gemessenen Werte deutlich von der der Erwartungswerte abweicht. Während beide Regressionen höchst signifikant waren (Erwartungswerte: R^2=1; gemessene Werte: R^2=0,943; für beide Regressionen p<0,001), lag die Regressionsgerade der gemessenen Werte signifikant unterhalb der der Erwartungswerte (Paired t-test: T=5,46; d.F.=27; p<0,001). Der Anteil der auf dem Biozement befindlichen Zellen war somit deutlich niedriger als der Erwartungswert (über alle Proben gemittelt lag er bei 30,25 %, eine Abweichung von durchschnittlich 53,8 %). In Tabelle 5 sind die gemessenen Werte, die Erwartungswerte und die Differenz bei verschiedenen Zellzahlen aufgetragen.

Tabelle 5: Gemessene Werte, erwartete Werte und die prozentuale Abweichung der gemessenen Werte bei unterschiedlichen Zellzahlen-

Startzellzahl	% Zellen auf Biozement	Erwartungswert [%]	Differenz in % (gemessen/Erwartungswert)
500.000	28,05	56,25	49,9
1.000.000	34,72	56,25	61,7
2.000.000	33,54	56,25	59,6
3.000.000	29,35	56,25	52,2
4.000.000	30,42	56,25	54,1
6.000.000	25,42	56,25	45,2

Die aufzentrifugierten Zellen verteilten sich nicht gleichmäßig auf den zur Verfügung stehenden Raum. Auf dem Träger landeten nur etwa 50 % der erwarteten Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnten Analysen, die mit dem Trägersystem durchgeführt wurden, in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl korrigiert werden. Ein direkter Einfluss des Trägers auf die Zellen ist wahrscheinlich.

3.2. Proliferation von humanen Chondrozyten

Die humanen Chondrozyten müssen für eine Anwendung sehr stark proliferiert werden, da aus einer Biopsie nur wenige (Größenordnung: 1-5*10^5) Zellen gewonnen wurden. Es stellt sich daher sie Frage, ob es für die Proliferation der humanen Chondrozyten Grenzen gibt. Des weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Zugabe von Faktoren wie bFGF oder PDGF-BB positiv auf die Proliferationsrate auswirkt.

Die Proliferation der humanen Chondrozyten wurde in üblichenZellkulturflaschen aus Polystyrol vorgenommen. Während der Expansion änderten die Zellen ihre Gestalt. Während sie zunächst kugelig an der Plastikoberfläche adhärierten, änderten sie innerhalb von zwei Tagen ihre Morphologie zu lang gestreckten, spindelförmigen Zellen (Abbildung 6). Bei der

Trypsinierung und damit der Ablösung vom Plastik, änderten die Chondrozyten ihre Form wiederum zu runden Zellen.

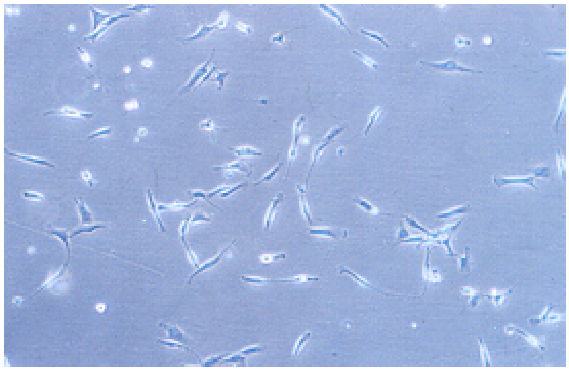


Abbildung 6: Typische Morphologie der proliferierenden humanen Chondrozyten nach Adhäsion an das Plastik der Zellkulturflasche. Chondrozyten der dritten Passage (hCh 8), einen Tag nach der Trypsinierung. Die typisch lang gestreckte, spindelförmige Gestalt der Chondrozyten ist dargestellt. Phasenkontrast, 200fache Vergrößerung.

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der humanen Chondrozyten zeigte, dass bei der Standardbehandlung mit bFGF und EGF der Verlauf der Proliferationskurve annähernd logarithmisch war (Abbildung 7). Innerhalb von 5 Passagen (28 Tage) wurde eine Expansion der Zellen um das 712-fache erreicht.

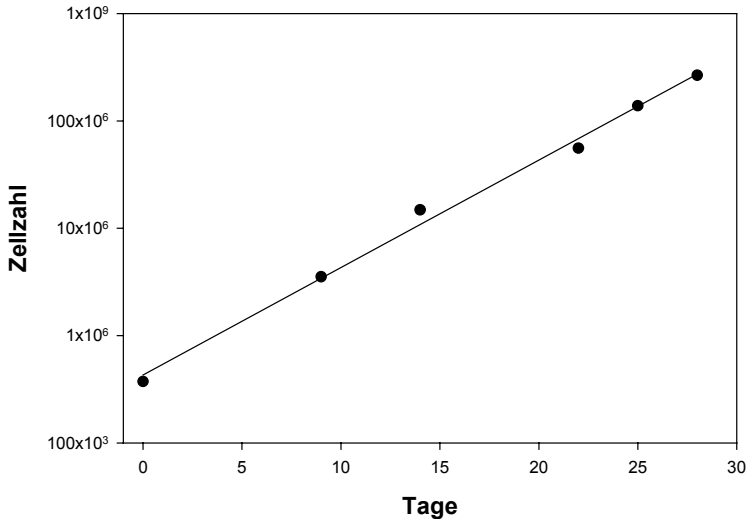


Abbildung 7: Wachstumskurve aus Zellen einer Präparation (hCh F1). Der Verlauf der Wachstumskurve ist annähernd logarithmisch. Die Zellen wurden etwa um das 712-fache expandiert. Jeder Punkt repräsentiert eine Passagierung (P0-P5), zusätzlich ist die Regressionsgerade eingezeichnet.

Bei der Proliferation von aufgetauten Zellen ergab sich eine ähnliche Wachstumskurve. Auch hier verlief die Kurve logarithmisch. Innerhalb von 3 Passagen wurde eine Expansion der Zellen um den Faktor 35,7 (FGF) bzw. 29,9 (FGF/PDGF) erreicht (Abbildung 8). Zwischen den Steigungen beider Regressionsgeraden konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

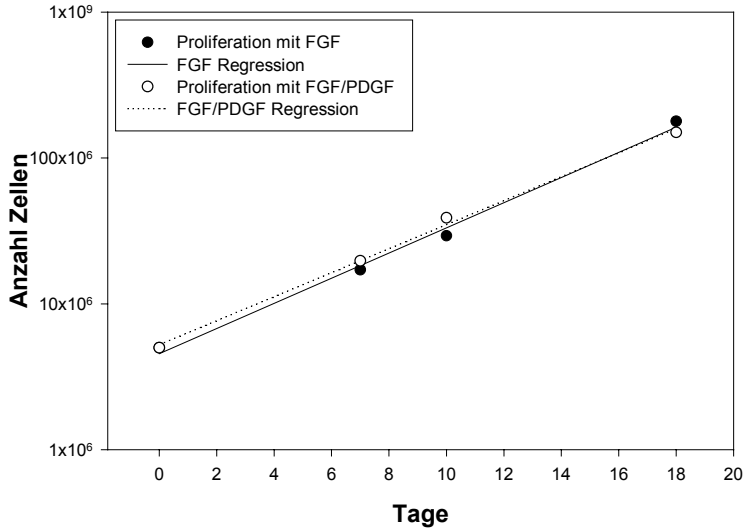


Abbildung 8: Wachstumsraten aufgetauter Zellen (hCh 8) bei unterschiedlicher Faktorenbehandlung. Die Chondrozyten wurden von P1 bis P5 proliferiert. Jeder Punkt repräsentiert eine Passagierung.

Im Gegensatz dazu proliferierten die Zellen kaum oder gar nicht, wenn diese Faktoren nicht zugegeben wurden (Abbildung 9).

Die Zugabe von PDGF-BB zum Standardmedium führte zunächst zu einer leichten Erhöhung der Proliferationsrate, die sich jedoch nur zwei Passagen hielt (Abbildung 8, Abbildung 9), wohingegen die Zellen bei alleiniger Supplementierung des Mediums mit PDGF-BB nur langsam proliferierten (Abbildung 9). Es waren keine Größen- oder morphologischen Unterschiede zwischen den mit FGF und den mit PDGF bzw. FGF/PDGF proliferierten Chondrozyten nachweisbar.

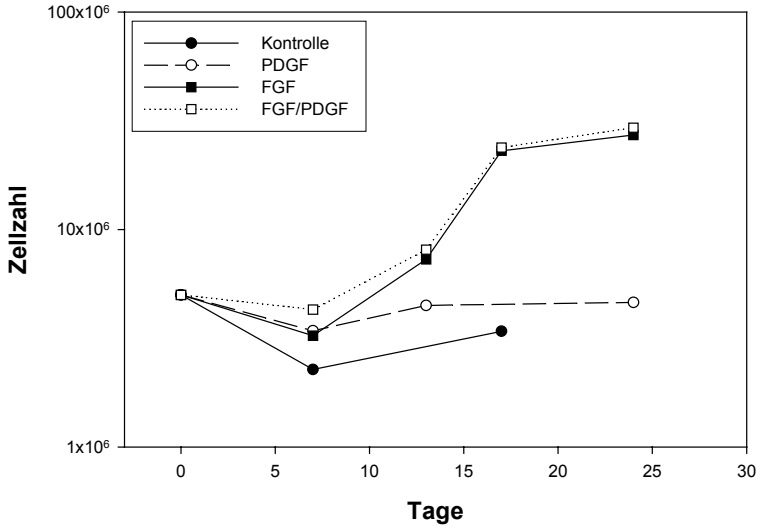


Abbildung 9: Proliferation aufgetauter Zellen mit unterschiedlich supplementiertem Medium. Kontrolle: ohne Faktoren; PDGF: 2 ng/ml PDGF-BB; FGF: 10 ng/ml bFGF; FGF/PDGF: 2 ng/ml PDGF-BB + 10 ng/ml bFGF. Jeder Punkt bezeichnet eine Passage (hCh-F1, P3-P7)

Die Kollagen-Bildung während der Proliferation stellte sich folgendermaßen dar: Während der zweiten und dritten Passage produzierten die Zellen noch geringe Mengen Kollagen II, jedoch zu einem größeren Anteil Kollagen I (Abbildung 10). Die Kombination von FGF und PDGF-BB führte zu einer leichten Erniedrigung des Kollagen I-Gehaltes in der vierten Passage gegenüber der reinen FGF-Substitution.

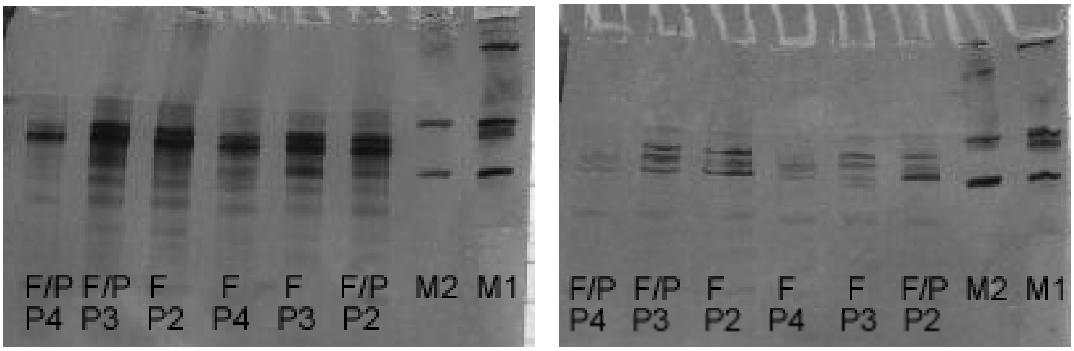


Abbildung 10: Kollagenbildung während der Proliferation bei unterschiedlicher Vorbehandlung. Es wurden Kollagenanalysen von Zellen der zweiten bis vierten Passage (P2-P4) durchgeführt, die entweder mit 10 ng/ml bFGF (F) oder 10 ng/ml bFGF und 2 ng/ml PDGF-BB (F/P) vorbehandelt wurden. Linker Blot = Kollagen I, rechter Blot = Kollagen II, M1 = Marker für Kollagen I, M2 = Marker für Kollagen II.

Unter normalen Bedingungen zeigen die Zellen eine hohe Proliferationsrate, die mit einem passagenabhängigen Verlust der Kollagen II-Produktion einhergeht. Dies deutet auf eine

beginnende Dedifferenzierung der Zellen hin. Für diese Vermutung spricht auch die beobachtete Änderung der Morphologie.

3.3. Abhängigkeit der Chondrogenesefähigkeit humaner Chondrozyten von der Passage und dem Alter des Spenders

Nach den im vorigen Kapitel beschriebenen Ergebnissen, sollte eingehender untersucht werden, ob eine passagenabhängige Dedifferenzierung stattfindet und wie weit sich diese auch in einem Verlust des Chondrogenesepotentials der Chondrozyten niederschlägt. Des weiteren sollte untersucht werden, welche Rolle das Alter des Spenders spielt.

Die Chondrogenesefähigkeit humaner Zellen wurde daher bei zwei Zellpräparationen von Spendern unterschiedlichen Alters getestet (hCh-8, 6 Jahre und hCh-9, 37 Jahre). Bei jeder Passagierung wurden $1*10^6$ Zellen auf Calcibon zentrifugiert, 14 Tage mit Proliferationsmedium (mit bFGF) und danach 21 Tage mit Chondrogenesemedium (mit IGF und TGF) inkubiert. Diese Behandlung entspricht dem 2-Phasen-System (vgl. Kap. 1.4) . Die Anfangswerte wurden entsprechend den Ergebnissen aus Kap. 2.4.2 korrigiert.

Es zeigte sich, dass die Chondrogenesefähigkeit der Zellen mit zunehmender Passagierung deutlich abnimmt. Eine Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Abnahme auch statistisch nachweisbar ist (Abbildung 11).

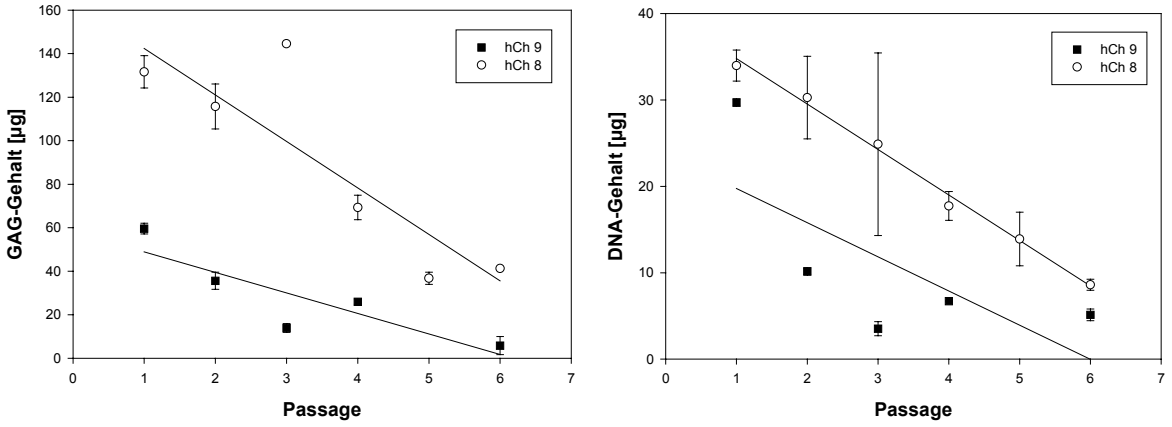


Abbildung 11: Vergleich der Zellpräparationen hCh 8 und 9. Der GAG-Gehalt (links) und der DNA-Gehalt (rechts) nahmen bei beiden Zelllinien signifikant mit zunehmender Passage ab. Angegeben sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Regressionen (Regressionskoeffizienten siehe Text). Bei hCh 9 wurde in der 5ten Passage kein Versuch durchgeführt.

Die Chondrozyten aus der Präparation hCh-8 zeigte bei den DNA- und GAG-Werten jeweils eine signifikante Abnahme mit zunehmender Passagenzahl (GAG: R^2=0,753, D.F.=13, p<0,001; DNA: R^2=0,851, D.F.=13, p<0,001). Die hCh-9-Zellen zeigten ebenfalls eine signifikante Abnahme beider Werte (GAG: R^2=0,742, D.F.=9, p<0,01; DNA: R^2=0,503, D.F.=9, p<0,05). Generell zeigten die Chondrozyten des jungen Spenders (hCh8) deutlich höhere Werte als die eines Adulten (hCh-9), sowohl GAG, als auch DNA betreffend.
Die DNA-Werte der auf dem Biozement befindlichen Zellen waren bei allen Ansätzen höher als die Startzellzahl, die verminderte Matrixsynthese kann also nicht durch ein Absterben der Zellen erklärt werden. Eine niedrige DNA-Produktion spricht dafür, dass die Chondrozyten nur noch in begrenztem Maße proliferierten.

Da bei hCh-8 sowohl die GAG-, als auch die DNA-Gehalte höher lagen als bei hCh-9, wurden zum Vergleich die G/D-Verhältnisse gebildet. Diese sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Zellen des jungen Spenders zeigten einen deutliches Maximum der Chondrogenesefähigkeit in der dritten Passage. Eine Tendenz zur Abnahme dieser Fähigkeit in späteren Passagen war nicht klar zu erkennen. Außer in der vierten Passage, wo sie auf gleichem Niveau lagen, waren die Werte immer höher als bei den Zellen des Adulten Spenders.
Bei diesen stellte sich ein Maximum der Chondrogenesefähigkeit in der dritten und vierten Passage dar. Man beobachtet einen „uhrglasförmigen“ Verlauf über die Passagen.

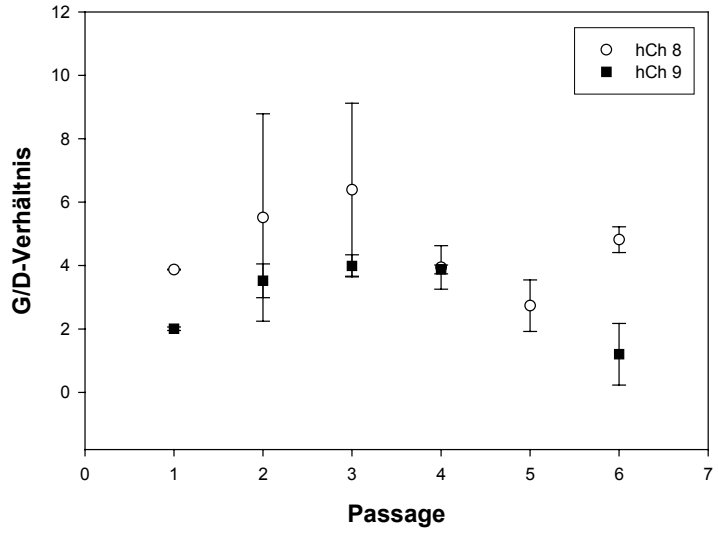


Abbildung 12: Vergleich des GAG/DNA-Verhältnisses der Zellpräparationen. Das GAG zu DNA-Verhältnis (G/D-Verhältnis) ist ein Maß für die Chondrogenesefähigkeit der Zellen. Je höher der Wert ist, desto mehr Gag wird pro DNA (und damit pro Zelle) gebildet.

Der Verlauf dieser Kurven spricht dafür, dass das Resultat zweier sich überlagernde Effekte zu beobachten ist. In den ersten Passagen überwiegt eine Stimulierung der Chondrogenesefähigkeit, in den darauf folgenden setzt sich als Folge der Passagierung eine entgegengesetzte Tendenz durch. In der sechsten Passage wird bei Chondrozyten von beiden Spendern kaum noch Matrix gebildet.

Das Bild stellte sich bei der Analyse der Kollagenbildung anders dar. Bei den jungen Zellen konnte die Kollagen II-Bildung nur bis in die vierte Passage nachgewiesen werden, mit einem Peak in der dritten Passage (Abbildung 14). Die eher unerwünschte Bildung von Kollagen I war in allen getesteten Passagen zu beobachten, sie nahm jedoch mit zunehmender Passagierung leicht ab. In der Immunfärbung waren sowohl Kollagen I als auch II nachweisbar. Die Verteilung von Kollagen I war gleichmäßig im gesamten gebildeten Gewebe, Kollagen II konnte nur in den inneren Bereichen nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Bei den Zellen des älteren Spenders (hCh-9) war die Kollagen II-Bildung von vorne herein niedriger. Deutliche Banden waren nur in den ersten zwei Passagen zu erkennen, danach konnten nur noch Spuren nachgewiesen werden. Auch die Kollagen I-Bildung war wesentlich deutlicher passagenabhängig. Es konnte eine Abnahme des Kollagengehalts von der ersten bis zur 6. Passage beobachtet werden (Abbildung 15).

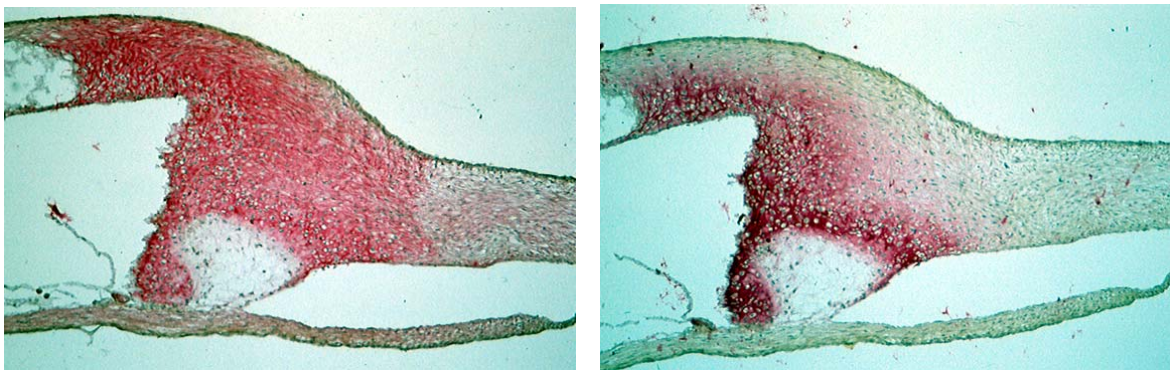


Abbildung 13: Immunhistologie des gebildeten Gewebes, Zelllinie hCh 8, dritte Passage. Im linken Bild wurde Kollagen I, im rechten Kollagen II angefärbt. Es sind entkalkte Pellets dargestellt, der Träger befand sich im linken Teil der Bilder. 100fache Vergrößerung.

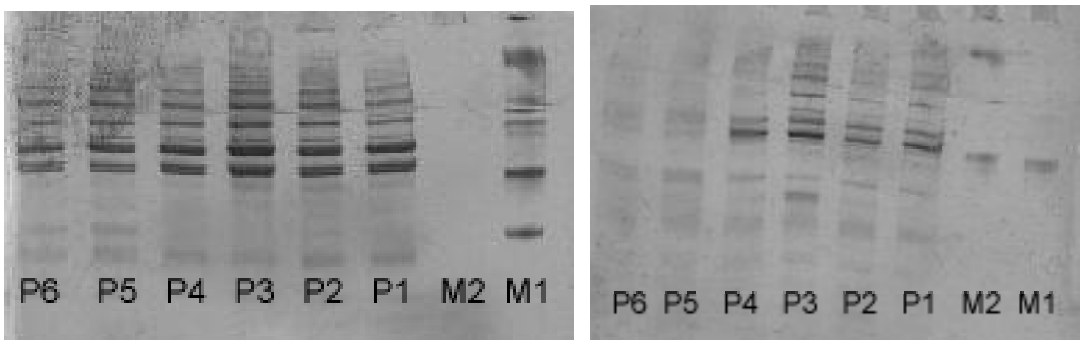


Abbildung 14: Kollagenbildung der Zellpräparation hCh 8 bei zunehmender Passagierung. Nach jeder Passage (P), beginnend mit der ersten, wurde der Kollagengehalt analysiert. Links ist Kollagen I, rechts Kollagen II dargestellt. M1 = Marker für Kollagen I, M2 = Marker für Kollagen II.

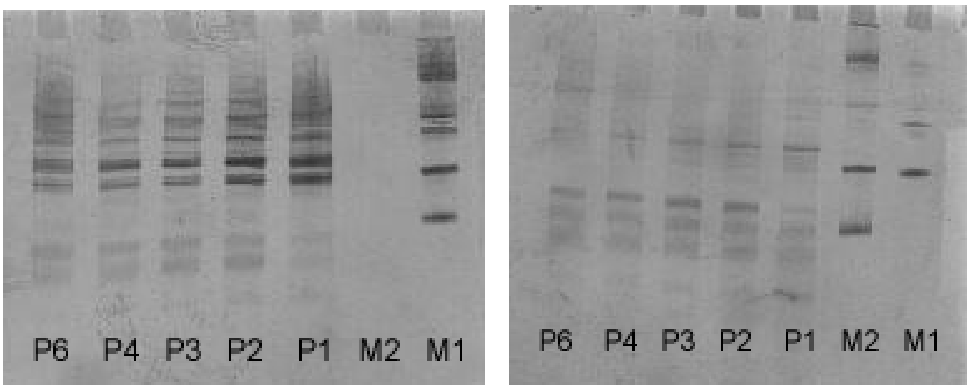


Abbildung 15: Kollagenbildung der Zellpräparation hCh 9 bei zunehmender Passagierung. Nach jeder Passage (P), beginnend mit der ersten, wurde der Kollagengehalt analysiert. Die fünfte Passage wurde nicht geblottet. Links ist Kollagen I, rechts Kollagen II dargestellt. M1 = Marker für Kollagen I, M2 = Marker für Kollagen II.

Damit wird also experimentell bestätigt: Das Chondrogenesepotential ist bei humanen Zellen deutlich altersabhängig. Bei einem jüngeren Spender wird abolut mehr GAG gebildet und die Kollagen II-Produktion kann länger beobachtet werden. Eine klare Passagenabhängigkeit kann nicht beobachtet werden. Mit zunehmender Passagierung wird absolut weniger Matrix und weniger Kollagen II gebildet, zellbezogen nimmt das Potential von jüngeren Chondrozyten im analysierten Zeitraum nicht signifikant ab. Bei Zellen von adulten Spendern kann ein Chondrogenesepotential in der zweiten und dritten Passage beobachtet werden. In diesen Passagen wird sowohl Martix, als auch Kollagen II gebildet.
Unabhängig vom Alter des Spenders war zu beobachten, dass im zwei-Phasen-System eine direkte Kopplung der Kollagen Typ II- und GAG-Synthese zu bestehen scheint. Beide nahmen mit zunehmender Passagierung ab. Die Bildung von Kollagen Typ I ist jedoch nicht mit der von Typ II korreliert. Kollagen I wurde länger gebildet als Kollagen II, zeigte jedoch ebenfalls eine passagenabhängige Abnahme.

3.4. Faktorenabhängiges Chondrogenesepotential im 2-Phasen System

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, in wie weit Zellen einer späten Passage (P9) durch Zugabe und Kombination von Wachstumsfaktoren und Cytokinen einschließlich deren Kombination beeinflusst werden. Von Interesse war vor allem das Chondrogenesepotential der Zellen, die intensiv passagiert worden waren, und daher stark dedifferenziert sein sollten.

Je 5 x 10^5 Zellen wurden zu high-density-Pellets zentrifugiert und drei Wochen bei 21 % O_2 mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen inkubiert: Kontrolle (ohne Faktoren); IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (1 ng/ml); IGF, TGF und Interleukin-4 (IL-4, 4 ng/ml); PDGF-BB (4 ng/ml), IGF und TGF; PDGF, IGF, TGF und IL-4; PDGF und bFGF (10 ng/ml).

In Bezug auf die Matrixbildung konnte nachgewiesen werden, dass bei allen Faktorenkombinationen nur geringe Mengen GAG gebildet wurden (maximal 12,8 µg, minimal 0,7 µg). Weiterhin zeigte sich, dass die Zugabe von Interleukin-4 immer eine Erhöhung des GAG-Gehalts bewirkte, die auch zu einer Verbesserung des G/D-Verhältnisses gegenüber der Kontrolle führte. Die Zugabe von PDGF-BB bewirkte ebenfalls eine (geringere) Steigerung der GAG-Produktion, die sich allerdings nicht so deutlich im G/D-Verhältnis niederschlug (Abbildung 16).

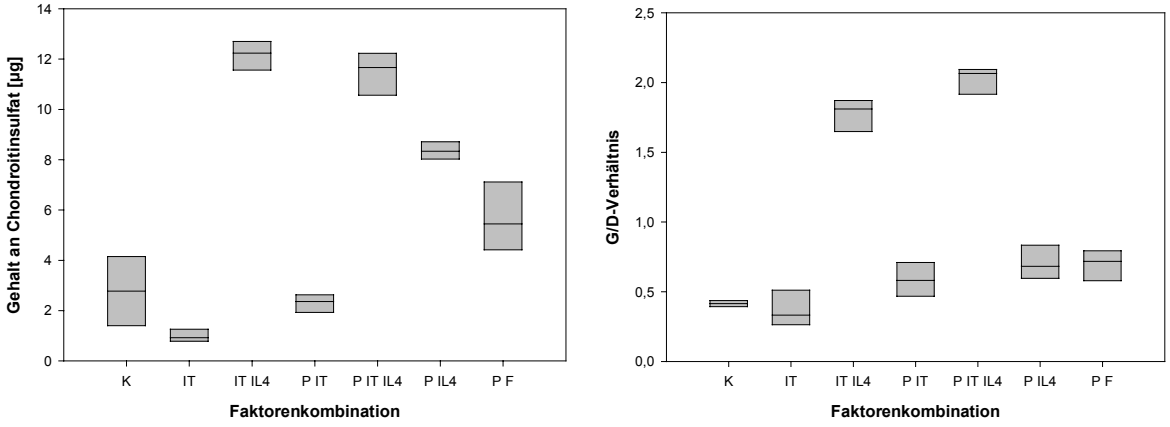


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Matrixbildung bei Zellen einer späten Passage (Passage 9). Je 5 x 10^5 Chondrozyten wurden zu hd-Pellets zentrifugiert und drei Wochen mit den angegebenen Faktoren inkubiert. K = Kontrolle; IT = Zugabe von IGF und TGF; IT IL4 = Zugabe von IGF, TGF und Interleukin 4; PIT = Zugabe von PDGF, IGF und TGF; PITIL4 = Zugabe von PDGF, IGF, TGF und IL-4; PIL4 = Zugabe von PDGF und IL-4; PF = Zugabe von PDGF und bFGF; Konzentrationen siehe Text.

Auch hinsichtlich der Kollagen-Synthese waren Unterschiede erkennbar (Abbildung 17). Direkt nach der Proliferation war kein Kollagen II nachweisbar, Kollagen I wurde in geringer Menge ausgebildet. Nach der Kultivierung zeigten alle Ansätze Kollagen Typ I und II-Banden, die der Kontrolle waren am schwächsten ausgeprägt. Analog zur Matrixbildung zeigte sich auch hier, dass die Zugabe von Interleukin-4 immer einen positiven Einfluss hatte. Sowohl die Kollagen I, als auch die Kollagen II-Banden waren deutlich ausgeprägt. Dagegen war bei der Supplementierung von PDGF kein Einfluss auf die Kollagensynthese feststellbar (vgl. IT ↔ PIT und ITIL4 ↔ PITIL4). Bei allen Ansätzen überwog die Kollagen Typ I-Bildung. Die faktorenabhängige Zunahme von Kollagen zeigte eine positive Korrelation zwischen Typ I und Typ II.

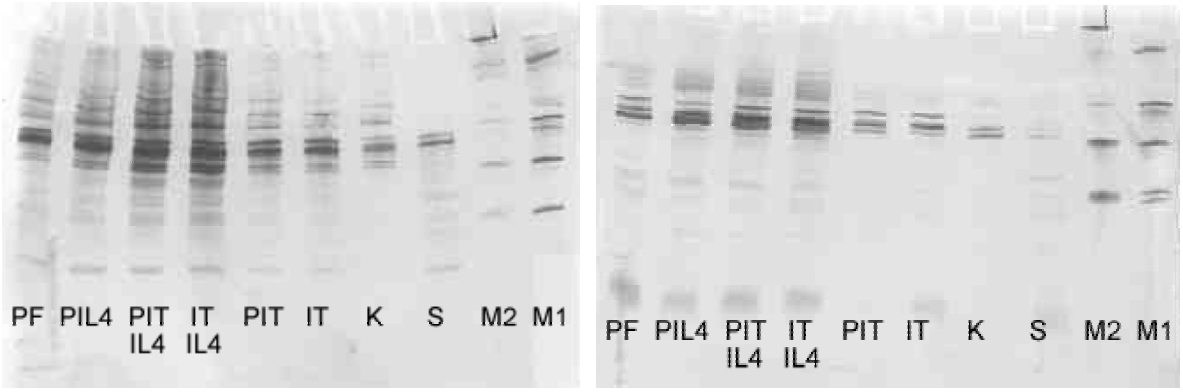


Abbildung 17: Kollagenbildung bei Zellen einer späten Passage (P9) im 2-Phasen-System.

Je 5 x 10^5 Chondrozyten wurden zu hd-Pellets zentrifugiert und drei Wochen mit den angegebenen Faktoren inkubiert. K = Kontrolle; IT = IGF und TGF; IT IL4 = IGF, TGF und Interleukin 4; PIT = PDGF, IGF und TGF; PITIL4 = Pdgf, IGF, TGF und IL-4; PIL4 = PDGF und IL-4; PF = PDGF und bFGF; Konzentrationen siehe Text. M1 = Marker für Kollagen I, M2 = Marker für Kollagen II, S = Startwert (Zellen direkt nach der Proliferation, P9, nicht als Pellets kultiviert), K = Kontrolle (ohne Faktoren), IT = Zugabe von IGF und TGF; IT IL4 = Zugabe von IGF, TGF und Interleukin 4; PIT = Zugabe von PDGF, IGF und TGF; PITIL4 = Zugabe von PDGF, IGF, TGF und IL-4; PIL4 = Zugabe von PDGF und IL-4; PF = Zugabe von PDGF und bFGF; Konzentrationen siehe Text. Links ist der Kollagen I-, rechts der Kollagen II-Blot dargestellt.

Damit läss sich als Fazit sagen: Intensiv passagierte Zellen besitzen nur wenig Chondrogenesepotential. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren kann dieses Potential im 2-Phasen-System jedoch erhöht werden. Prominent ist in diesem Zusammenhang die Wirkung von Interleukin-4, die zu einer deutlichen Steigerung der GAG-Synthese führt. Generell ist im zwei-Phasen-System eine Zunahme von GAG auch mit einer Zunahme des Kollagengehaltes verbunden. Weiterhin korreliert die Zunahme des Kollagen Typ II-Gehalts mit der von Typ I.

3.5. Redifferenzierung der Zellen im Alginatsystem

Mit der Technik der Einbettung in Alginat wird den Zellen vor der eigentlichen Initiierung der Chondrogenese eine zeitlich abgegrenzte Gelegenheit zum Erreichen des differenzierten Status geboten. Ziel dieser Redifferenzierungsphase ist die Sensibilisierung der Zellen gegenüber den anschließend zur Auslösung der Chondroneogenese applizierten Zell-Zell-Kontakten (vgl. Kap. 1.3.3). Als wichtigste Marker für einen Erfolg der Redifferenzierung sollen in den folgenden Experimenten vorläufig die selben Kriterien wie für die Beurteilung des eigentlichen Chondrogenesepotentials gewertet werden, nämlich die Bildung von Kollagen II, eine erhöhte Matrixbildung in der Nähe der Pseudochondrone sowie eine phänotypisch runde Ausprägung der Zellen im Laufe der Kultivierung im Alginatsystem. In wie weit das Verhalten der zur Redifferenzierung im Alginat-Gel eingebetteten isolierten Chondrozyten tatsächlich Schlüsse auf deren Produktionsleistungen während der anschließend durch intensive Zell-Zell-Kontakte zu induzierenden Chondrogenese-Phase zulässt, bleibt dabei zunächst offen.

3.5.1. Morphologie

Zellen, die für einen längeren Zeitraum in Alginat eingebettet wurden, zeigten eine typische Form. Meist lagerten sich zwei bis drei Zellen zusammen, die um sich herum perizelluläre Matrix bildeten, die sogenannten Pseudochondrone. Durch Färbung mit DMMB und biochemische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Bestandteilen der perizellulären Matrix um Glykosaminoglykane, Prokollagen II und Kollagen I handelte.
Es zeigten sich auch Unterschiede in der Gestalt der Zellen. Während die Zellen bei der Proliferation eine fibroblastenähnliche Gestalt aufwiesen (vgl. Abbildung 6), zeigten sie im Alginat eine kugelige Gestalt (Abbildung 18).

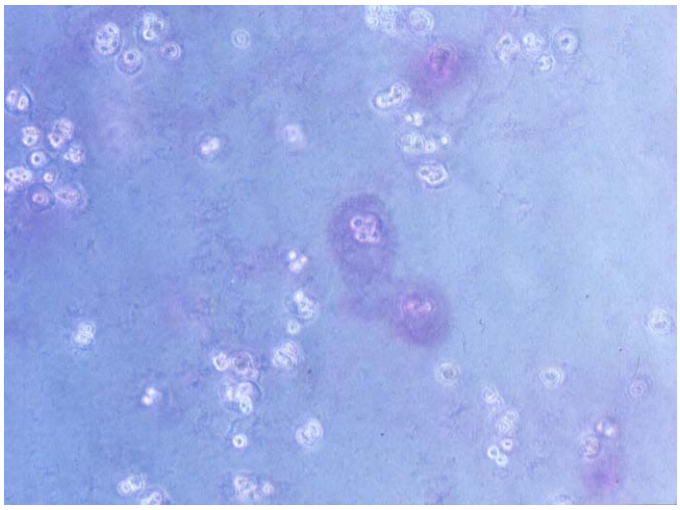


Abbildung 18: Pseudochondrone nach der Elution aus Alginat. Humane Chondrozyten (hCh 9) wurden 21 Tage in Alginat mit IGF-I und TGF-β_1 behandelt. Nach der Elution wurden sie mit Dimethylmethylenblau (DMMB) gefärbt. Mehrere Chondrozyten lagern sich zu einem Chondron zusammen und sekretieren mit DMMB anfärbbare Matrix. Die Chondrozyten zeigen einen runden Phänotyp. Phasenkontrast, 100fache Vergößerung.

3.5.2. Einflussfaktoren: Sauerstoffpartialdruck, Serum und Verweildauer

Die Änderung der Morphologie von in Alginat eingebetteten Chondrozyten deutet bereits auf einen Erfolg der Redifferenzierungsphase hin. Daher sollte weiterhin untersucht werden, ob sich diese Technik für eine Synchronisierung der unterschiedlich weit differenzierten Zellpopulationen nutzen lässt und wie sich Differenzierungssignale und Kulturbedingungen auf die beabsichtigte Redifferenzierung der Zellen auswirken. Als Maß für die Redifferenzierung sollte die Stimulierung der Chondroneogenese, das heißt, die Qualität der gebildeten Knorpelpellets herangezogen werden.

Der Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks wurde untersucht, indem die proliferierten Chondrozyten (3. Passage) während 14 Tagen eingebettet in Alginat in Gegenwart von 5 % und 21 % O_2-Partialdruckin der Gasphase kultiviert wurden. Es stellte sich heraus, dass eine Kultivierung bei 21 % die Bildung von Kollagen beider Typen begünstigte (Abbildung 19). Die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks auf 5 % vermindert selektiv die Bildungsrate von Kollagen Typ I, die Bildung von Kollagen Typ II ist davon weniger betroffen (Abbildung 20). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks die Redifferenzierung der Zellen begünstigt.

In den Abbildungen 19 und 20 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Kollagenbildung von der Wahl des Serums abhängig ist. Die Zugabe von fötalem Kälberserum führte zu höherem

Kollagen I- und niedrigerem Kollagen II-Gehalt. Eine Zugabe unterschiedlicher Humanseren zeigte ausserdem, dass Seren unterschiedlicher Donoren die Differenzierung in unterschiedlichem Ausmass unterstützen. Die Zugabe von geeignetem Humanserum während der Alginatphase wird daher als Vorraussetzung für eine erfolgreiche Redifferenzierung angesehen.

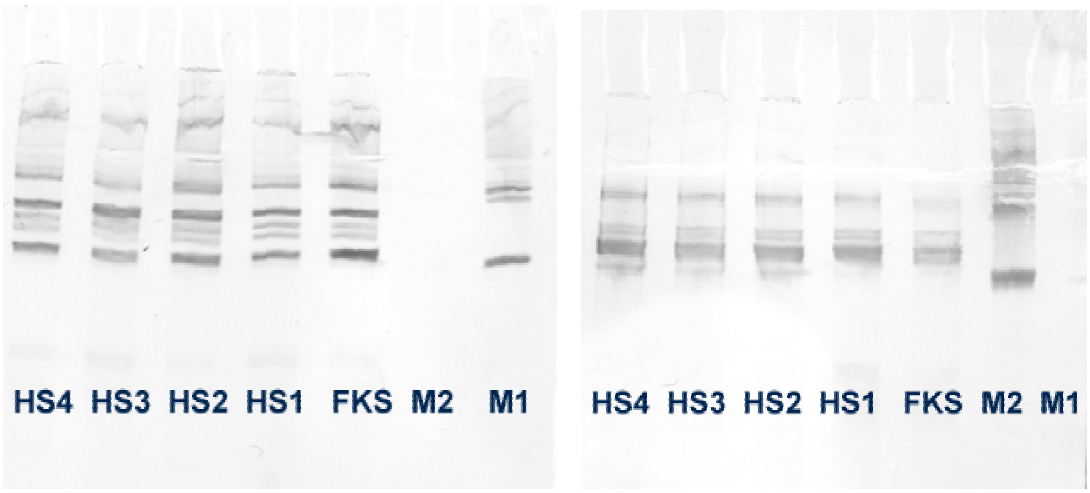


Abbildung 19: Bildung von Kollagen nach 2 Wochen in Alginat bei 21 % O_2 und bei Zugabe unterschiedlicher Seren. Die Chondrozyten der 3. Passage wurden zwei Wochen in Alginat eingebettet und mit IGF und TGF, sowie unter Zugabe verschiedener Seren kultiviert. Die Pseudochondrone wurden isoliert und analysiert Links: Kollagen I, rechts Kollagen II. M = Marker, FKS = fötales Kälberserum, HS = Humanserum.

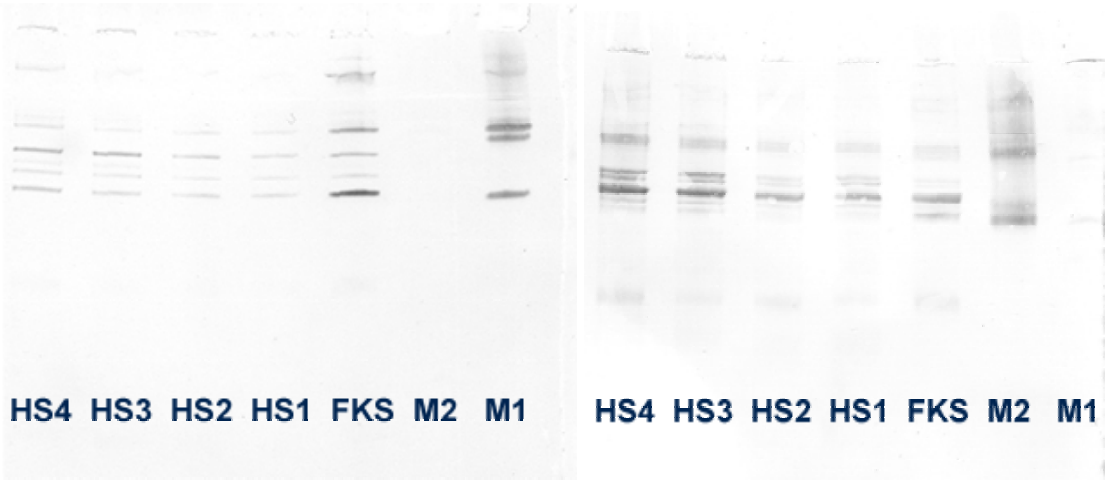


Abbildung 20: Bildung von Kollagen nach 2 Wochen in Alginat bei 5 % O_2 und bei Zugabe unterschiedlicher Seren. Kollagen I links, Kollagen II rechts. Versuchsbedingungen und Beschriftung wie Abbildung 19.

Die Verweildauer in Alginat spielt bei der Differenzierung ebenfalls eine Rolle. Um den Einfluss der Dauer der Redifferenzierungsphase zu überprüfen, wurden humane Chondrozyten der achten Passage bei 5 % O_2-Partialdruck und in Gegenwart von IGF-I, TGF-β_1 und IL-4 für zwei, drei und vier Wochen in Alginat kultiviert, anschliessend isoliert und analysiert.

Unmittelbar nach der Proliferation war kaum Chondroitinsulfat messbar. Mit zunehmender Verweildauer in Alginat stieg der GAG-Gehalt kontinuierlich an, ein Zeichen dafür, dass die Zellen perizelluläre Matrix bilden, also nicht mehr proliferieren. (Abbildung 21).

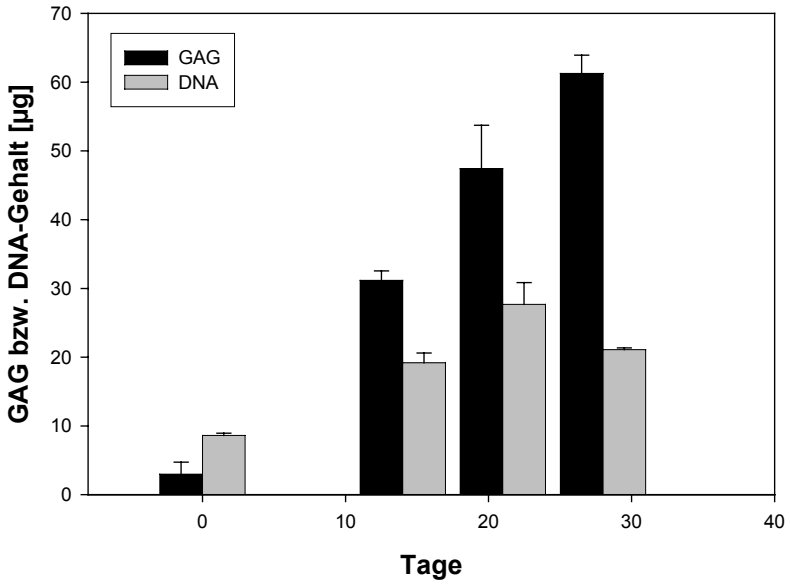


Abbildung 21: Einfluss der Verweildauer in Alginat auf die Matrixbildung der Zellen. Die schwarzen Balken bezeichnen die gemessenen GAG-Werte, die grauen die DNA-Werte. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Auch die G/D-Relation stieg an, ein Zeichen dafür, dass pro Zelle mehr Matrix gebildet wurde. Der Unterschied von zwei zu drei Wochen war nicht besonders ausgeprägt, in der nächsten Woche war jedoch ein deutlicher Sprung zu erkennen. Eine Regression über das Verhältnis von GAG zu DNA ergab eine signifikante Zunahme (R^2=0,9153, D.F.=11, p<0,001) des Wertes mit zunehmender Verweildauer (Abbildung 22).

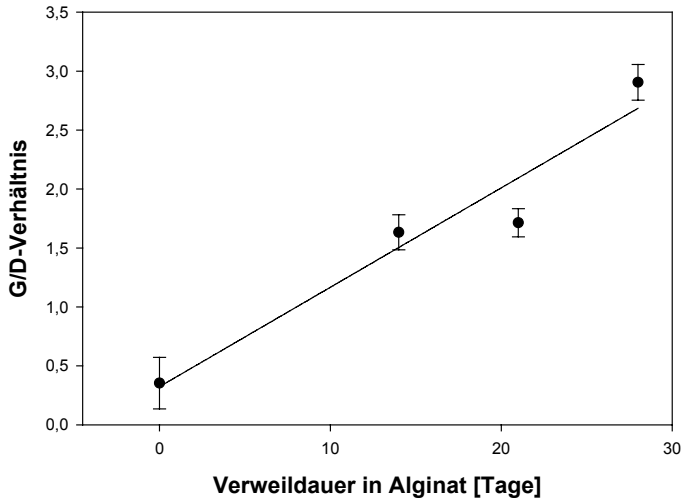


Abbildung 22: Regression der GAG/DNA-Verhältnisse mit zunehmender Verweildauer in Alginat.

Die Kollagenbildung unterschied sich nur in Bezug auf Kollagen I zwischen den verschiedenen Verweildauern. Nach der Alginatphase waren nur Spuren von Kollagen II nachweisbar, während der Kollagen I-Gehalt mit zunehmender Verweildauer anstieg. Aus der Bildung von Kollagen liessen sich in diesem Fall keine Hinweise auf eine erfolgte Differenzierung der Chondrozyten ableiten (Abbildung 23).

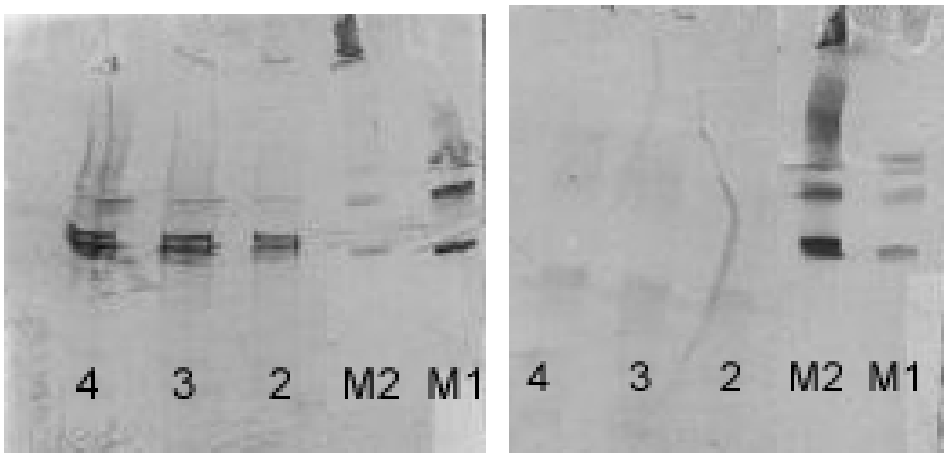


Abbildung 23: Kollagenbildung während unterschiedlicher Verweildauern in Alginat. Die Chondrone wurden zwei bis vier Wochen bei 5 % Sauerstoff mit IGF-I, TGF-β_1 und Interleukin-4 inkubiert, aus dem Gel isoliert und analysiert. Links: Kollagen I, rechts: Kollagen II.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sich ein deutlicher Einfluss der Redifferenzierungsphase feststellen lässt. In der Redifferenzierungsphase wird einen Teil der bisher dedifferenzierten Zellen wieder der Chondrogenese zugänglich gemacht, wenn man

die Zunahme der GAG-Synthese mit zunehmender Verweildauer als Kriterium heranzieht. Offensichtlich lässt sich ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck als Differenzierungssignal nutzen. Zum Einen wird die Kollagen I-Synthese reduziert, zum Anderen führt die Kombination mit Humanserum bei wenig passagierten Zellen zu einer Erhöhung der Kollagen II-Synthese. Bei intensiv passagierten Zellen bleibt die Kollagen II-Synthese dagegen fast völlig aus. Deren Steuerung scheint nicht streng an die der GAG-Synthese gekoppelt zu sein.

3.5.3. Optimierung der Redifferenzierung

Nachdem die Einführung der Alginatphase bereits erste Hinweise auf eine Redifferenzierung der Chondrozyten liefern konnte, sollte durch gezielten Einsatz von Wachstumsfaktoren versucht werden, eine biochemisch messbare Redifferenzierung der Zellen auch hinsichtlich des Kollagen Typ II-Gehalts erreicht werden. Aufgrund der Ergebnisse, die im vorigen Kapitel dargestellt sind, wurden reduzierter Sauerstoffpartialdruck und die Zugabe von Humanserum als Standardbedingungen gewählt.
Für einige Faktoren wurde die Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht, während andere konstant supplementiert wurden. Die Kandidaten, von denen einpositiver Einfluss auf die Differenzierung erwartet wurde, waren Interleukin-4, TGF-β_1 und PDGF-BB.

3.5.3.1. Einfluss von Interleukin-4

Der Einfluss von Interleukin-4 auf die Matrix- und Kollagensynthese während der Chondroneogenese konnte bereits im 2-Phasen-System beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.4). Für die Redifferenzierungsphase ist vor allem die Stimulierung der Kollagen Typ II-Synthese relevant. Um den Einfluss von IL-4 auf die Redifferenzierung zu untersuchen, wurden Zellen der achten Passage (Zelllinie hCh 8) drei Wochen in Alginat in Kombination mit IGF und TGF und steigenden Konzentrationen von Interleukin-4 kultiviert.
Die Bildung perizellulärer Matrix war bei allen Konzentrationen von Interleukin-4 höher als in der Kontrolle. Es ergaben sich signifikante Unterschiede bei den G/D-Verhältnissen (One-Way RM ANOVA, Tukey-Test; K - 0,2 ng: $q=8{,}646$, $p<0{,}001$; K - 1 ng: $q=10{,}164$, $p<0{,}001$; K - 2 ng: $q=6{,}418$, $p<0{,}01$; K - 4 ng: $q=7{,}071$, $p<0{,}01$). Zwischen den Werten bei unterschiedlichen Konzentrationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Matrixbildung wird durch die Zugabe von Interleukin-4 stimuliert. Tendenziell wurde bei den absoluten GAG-Werten, wie auch den G/D-Verhältnissen bei der Zugabe von 1 ng/ml Interleukin-4 die höchsten Werte erreicht. Die anderen Konzentrationen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (Abbildung 24).

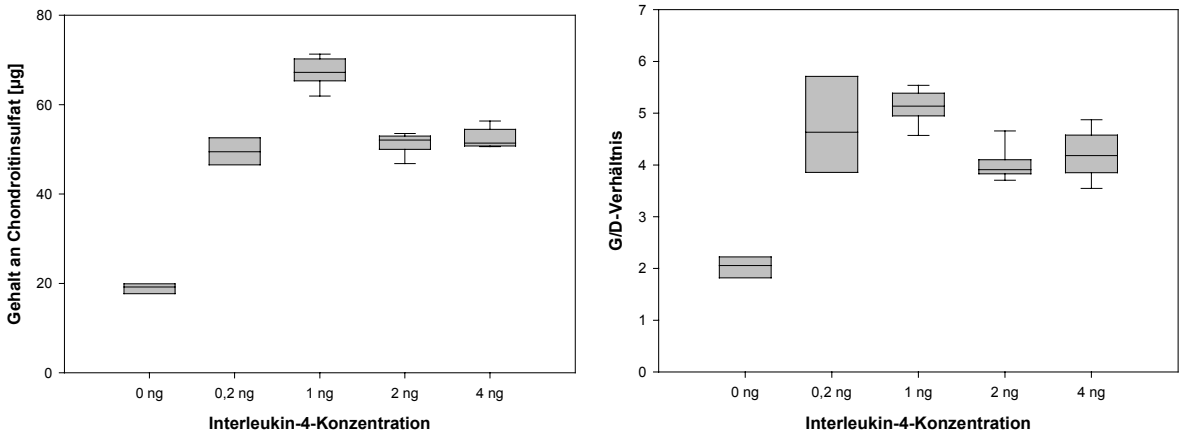


Abbildung 24: Einfluss der Interleukin-4-Konzentration auf die Bildung perizellulärer Matrix im Alginatsystem. hCh 8-Zellen der achten Passage wurden 3 Wochen in Alginat mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-ß1 (10 ng/ml) und den angegebenen Konzentrationen von Interleukin-4 kultiviert. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte, in der rechten die G/D-Verhältnisse dargestellt.

Ein noch deutlicheres Signal für eine erfolgte Redifferenzierung liess sich anhand der Kollagenblots nachweisen. Im Alginatsystem stieg der Prokollagen II-Gehalt mit zunehmender Interleukin-4-Konzentration deutlich an. Während bei 0,2 ng in der achten Passage noch kein Prokollagen II gebildet wurde, war der Anteil bei 4 ng deutlich ausgeprägt. Hinsichtlich der Kollagen Typ II-Bildung findet also eine konzentrationsabhängige Stimulation der Redifferenzierung statt. Eine Bildung von Kollagen I war ebenfalls in allen Ansätzen zu beobachten, der Gehalt nahm jedoch nur leicht zu (Abbildung 25).

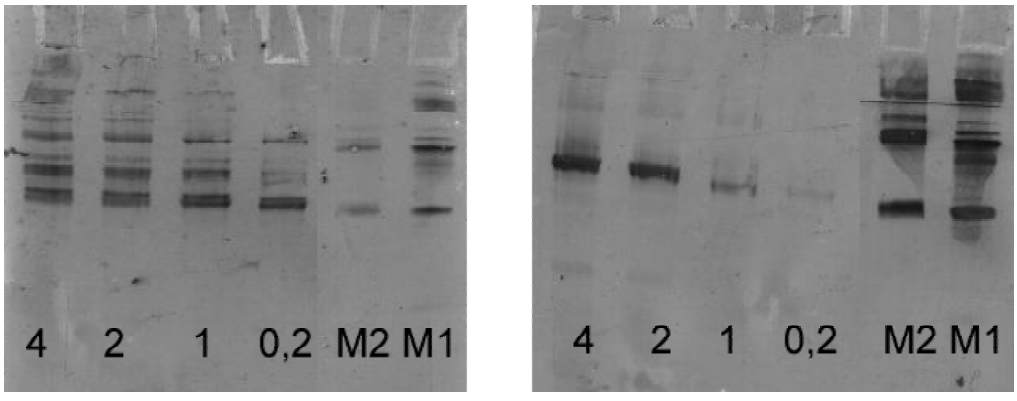


Abbildung 25: Abhängigkeit der Kollagenbildung von der Interleukin-4-Konzentration in der Alginatkultur. Chondrozyten der achten Passage wurden 3 Wochen bei 5 % O_2 mit Chondrogenesemedium und den angegebenen IL-4-Konzentrationen [ng/ml] in Alginat kultiviert. Links: K I, rechts: K II.

Interleukin-4 hat einen sichtbaren Einfluss auf die Redifferenzierung. Die Synthese des Kollagen Typ II wird konzentrationsabhängig stimuliert. Die Bildung von Typ I und II scheint sich mit diesem Cytokin entkoppeln zu lassen. Auch die Matrixsynthese wird während der Redifferenzierung stimuliert. Die beobachtete Entkopplung von GAG- und Kollagensynthese wird bestätigt.

3.5.3.2. Einfluss von TGF-β_1

Der Einsatz von multifunktionellen Wachstumsfaktoren während der Redifferenzierung könnte essentiell sein. Gerade TGF zeichnet sich durch seine verschiedenen Wirkungsweisen aus, die vom Grad der Zelldifferenzierung abhängen. Daher wurde der Einfluss von TGF-β_1 durch Kultivierung von Chondrozyten der achten Passage mit IGF-I (100 ng/ml) und steigenden Konzentrationen von TGF-β_1 bei reduziertem Sauerstoffgehalt untersucht.

Gemessen an der Bildungsrate der extrazellulären Matrix erwies sich der Effekt von TGF-β_1 auf die Redifferenzierung als negativ konzentrationsabhängig. Mit zunehmender Konzentration nahm die Matrixsynthese sowohl absolut als auch relativ bezogen auf die zelluläre DNA (G/D-Verhältnis) leicht ab (Abbildung 26). Eine Ausnahme bildete die Kontrolle (0 ng), da der absolute GAG-Gehalt hier niedriger war als in den anderen Ansätzen, das G/D-Verhältnis jedoch am höchsten.

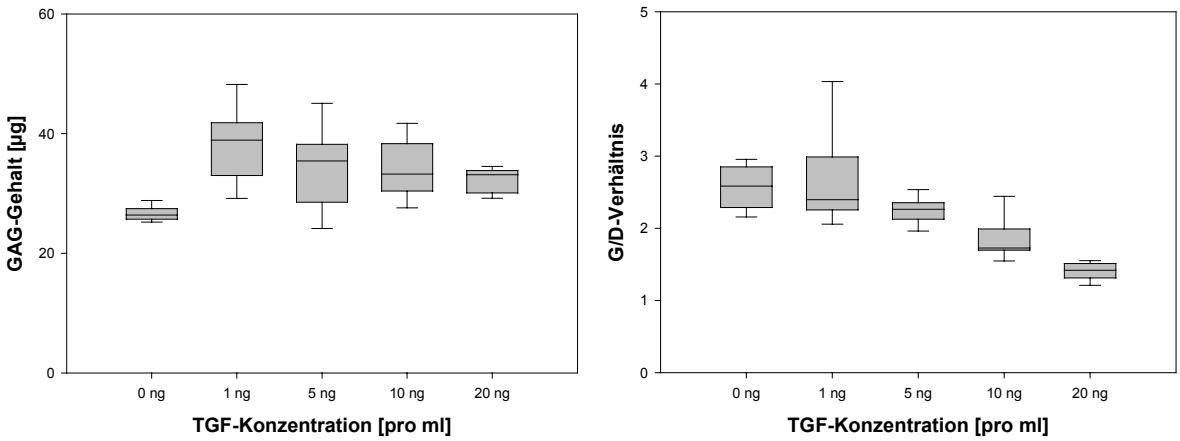


Abbildung 26: Einfluss der TGF-β_1-Konzentration auf die Matrixsynthese während der Alginatkultur. Die Zellen wurden mit IGF-I (100 ng/ml) und den angegebenen TGF-Konzentrationen drei Wochen bei 5 % O2 in Alginat kultiviert. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte aufgetragen, die rechte zeigt die G/D-Relationen.

Wie die Regressionsanalyse in Abbildung 27 zeigt, fällt die auf den DNA-Gehalt bezogene Matrixproduktion mit steigender TGF-Konzentration signifikant ab. Es bestand eine negative

Korrelation zwischen dem G/D-Verhältnis und der Zunahme der TGF-Konzentration (Lineare Regression, R^2=0,578, p<0,001, n=33). Allerdings zeigen die Absolutwerte der GAG-Produktion bei einer Konzentration von 1 ng/ml ein flaches Maximum. Dies kommt durch möglicherweise eine Überlagerung zu Stande: Zum einen bewirkt TGF eine Hemmung der Proliferation und eine leichte Stimulation der Redifferenzierung bei dedifferenzierten Chondrozyten, zum anderen macht sich bemerkbar, dass differenzierte Zellen sich mitogen stimulieren lassen.
Da die Matrixbildung als Redifferenzierungsmarker nur von sekundärer Bedeutung ist, liegt das Hauptaugenmerk auf der Bildung von Kollagen.

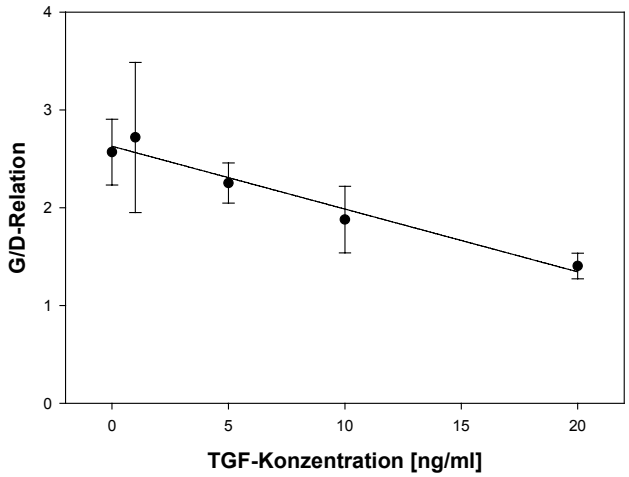


Abbildung 27: Regression des G/D-Verhältnisses gegen die TGF-Konzentration. Die lineare Regression zeigte einen Zusammenhang zwischen der TGF-Konzentration und dem G/D-Verhältnis. Mit zunehmender Konzentration nahm das G/D-Verhältnis ab. R=0,76; R^2=0,578; p<0,001; n=33; Regressionsgleichung: G/D=2,6288-(0,0642 * Konz.)

Die Kollagenbildungsrate zeigt im Gegensatz zur Matrixsynthese eine positive Konzentrationsabhängigkeit. Während der Kollagen I-Gehalt bei allen Ansätzen in etwa gleich blieb, führte eine zunehmende TGF-Konzentration zu einer starken Zunahme des Prokollagen II, erkennbar an der Ausprägung von Kollagen II-Banden (Abbildung 28). Damit konnte ein klarer Redifferenzierungsprozess nachgewiesen werden, während dessen die Zunahme an an (pro-) Kollagen II deutlich gegenüber der von Kollagen I überwog.

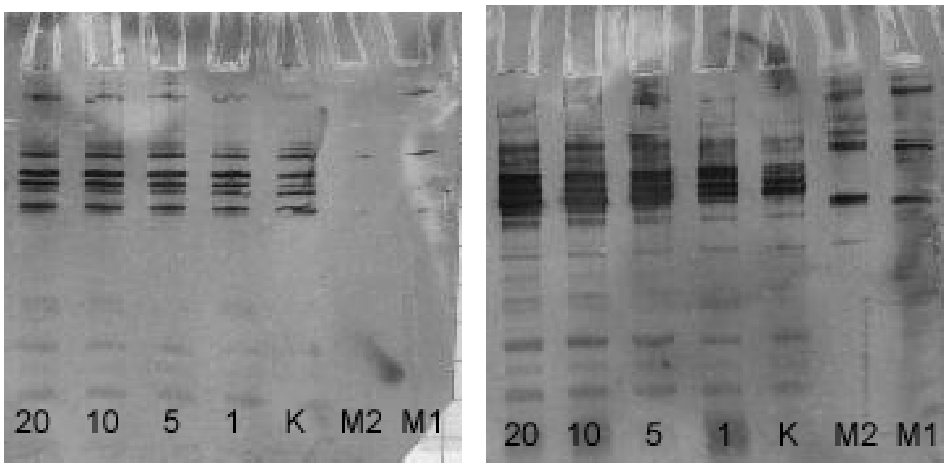


Abbildung 28: Kollagenbildung bei unterschiedlichen TGF-Konzentrationen in der Alginatkultur. Die Zellen wurden mit IGF-I (100 ng/ml) und den angegebenen TGF-Konzentrationen [ng/ml] drei Wochen bei 5 % O2 in Alginat kultiviert. In der linken Grafik sind die Kollagen I-Werte aufgetragen, die rechte zeigt die Werte für Kollagen II.

Damit ergibt sich als Fazit: TGF stimuliert konzentrationsabhängig die Kollagen II-Synthese und damit die Redifferenzierung der Chondrozyten. Die GAG-Synthese scheint nahezu vollständig von der Kollagensynthese entkoppelt zu sein (negative Korrelation). Die Wirkung von TGF ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Dedifferenzierte Zellen werden redifferenziert, differenzierte leicht mitogen stimuliert. Eine Unterstützung der Synchronisation der Chondrozyten zu einem einheitlichen Differenzierungsgrad ist damit gegeben. Die bei anderen Ansätzen beobachtete Korrelation zwischen der Synthese von Typ I und II-Kollagen konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden, die Kollagen II-Synthese wird selektiv stimuliert.

3.5.4. Einfluss von PDGF-BB

Kompetenzfaktoren wie PDGF-BB bewirken einen Übergang der Zellen in die Synthesephase und können eine Rezipienz der Zellen für andere Faktoren induzieren. Dieser Effekt ist während der Redifferenzierung erwünscht, da davon ausgegangen wird, dass eine Dedifferenzierung zur Abschaltung bestimmter Signalwege führt.

Daher wurde ein Vergleich zwischen einer Kontrolle, einer reinen PDGF-Zugabe, dem Chondrogenesemedium mit IGF und TGF und einer Kombination aus Chondrogenesemedium und PDGF gezogen. In diesem Versuch wurden Zellen der vierten Passage genutzt, die 3 Wochen bei 5 % Sauerstoff kultiviert wurden.

Die Matrixsynthese während der Redifferenzierung war bei allen Ansätzen auf gleichem, im Verhältnis zu den anderen getesteten Faktoren niedrigen, Niveau. Beim G/D-Verhältnis waren nur leichte Unterschiede zu erkennen, die reine PDGF-Zugabe führte zum besten Verhältnis. Eine Stimulierung der Matrixsynthese ist nicht zu beobachten.

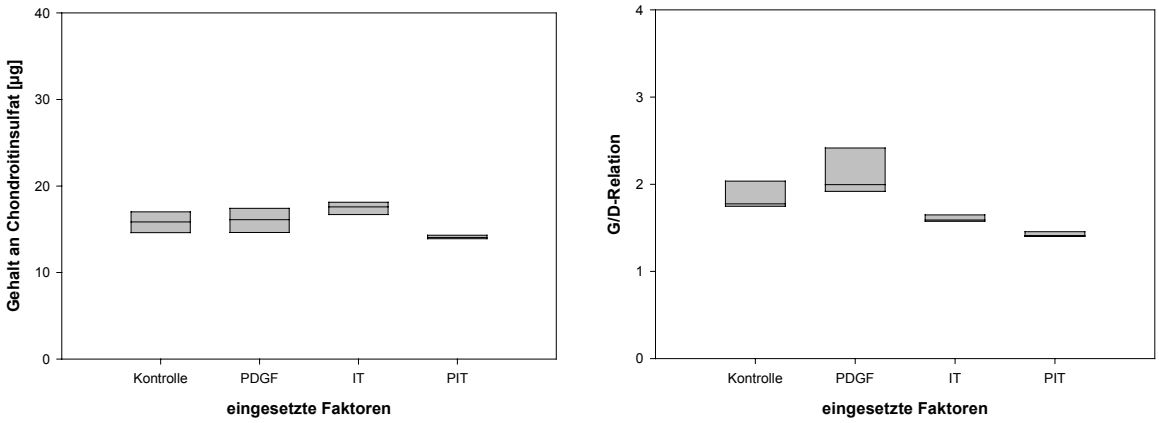


Abbildung 29: Einfluss verschiedener Kombinationen von Wachstumsfaktoren während der Alginatphase auf die Matrixbildung. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte gegen die eingesetzten Faktoren aufgetragen, in der rechten das GAG/DNA-Verhältnis. PDGF: Zugabe von 2 ng/ml PDGF-BB; IT: Zugabe von 100 ng/ml IGF-I und 10 ng/ml TGF-β_1; PIT: Zugabe von PDGF-BB, IGF-I und TGF- β_1.

Die Kollagenbildung wurde in größerem Maße beeinflusst. Nach der Alginatphase war in der Kontrolle und bei PDGF kein Kollagen II nachweisbar, Kollagen I zeigte eine schwache Bande. Hinweise auf eine Redifferenzierung zeigten sich bei Zugabe von IT und PIT durch die Bildung von (pro-)Kollagen II, bei IT wurde etwas mehr als bei PIT gebildet. Kollagen I war ebenfalls im gleichen Verhältnis vorhanden (Abbildung 30). Die Stimulierung der Kollagen Typ II-Synthese kann daher auf die Zugabe der Kombination von IGF und TGF zurückgeführt werden, die Zugabe von PDGF führt nicht zu einer Stimulierung.

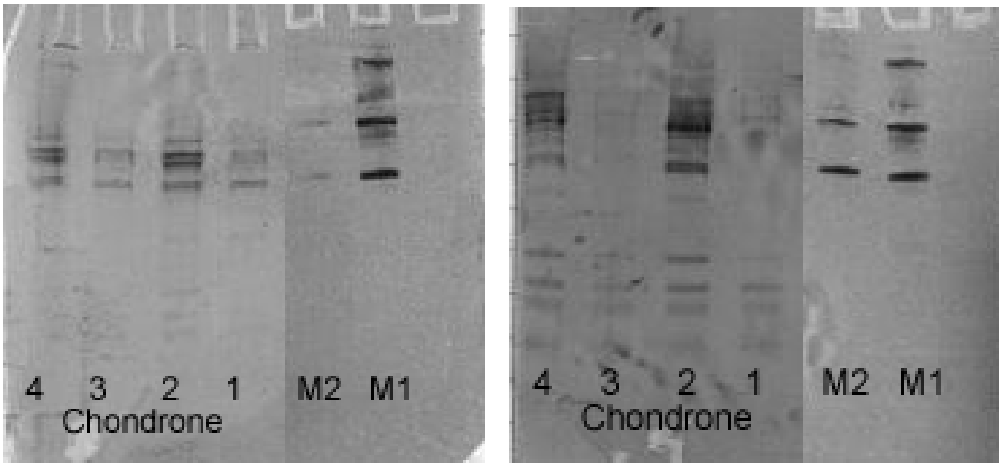


Abbildung 30: Einfluss der Faktorenkombinationen während der Redifferenzierung auf die Kollagenbildung. Chondrozyten der dritten Passage (hCh 8) wurden drei Wochen mit den angegebenen Faktorenkombinationen bei 5 % O_2 in Alginat kultiviert (Chondrone). Zugegebene Faktoren waren 1 = Kontrolle (ohne Faktoren); 2 = IGF und TGF; 3 = PDGF; 4 = IGF, TGF und PDGF. Links ist der Kollagen I-Blot, rechts der Kollagen II-Blot abgebildet.

Für den Einfluss der PDGF-Zugabe während der Alginatphase wurde darüber hinaus versucht, eine Konzentrationsabhängigkeit nachzuweisen. Dazu wurde das Redifferenzierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB und mit gleichbleibenden Konzentrationen von IGF-I und TGF-β_1 supplementiert. Es wurden Zellen der achten und, zum Vergleich, der dritten Passage eingesetzt.

Die Zellen der achten Passage zeigten in Bezug auf die absolute GAG-Produktion einen u-förmigen Verlauf. Bei 0,2 ng/ml und bei 4 ng/ml wurden die höchsten GAG-Werte gemessen. Bei der G/D-Relation zeigte sich ein leicht anderes Bild. Bei 0,2 ng wurden die höchsten Werte erreicht. Über dieser Konzentration waren die Relationen geringer, zeigten jedoch mit zunehmender Konzentration eine leichte Steigung. Bei den weniger intensiv passagierten Zellen (P 3) wurde in Bezug auf die Matrixsynthese eine negative Korrelation zwischen der PDGF-Konzentration und der Bildung von Chondroitinsulfat festgestellt. Mit zunehmender Konzentration sank der absolute GAG-Gehalt. Beim G/D-Verhältnis waren zwischen den Chondronen, die mit den unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert wurden, nahezu keine Unterschiede in den Mittelwerten sichtbar. Im Vergleich zu Zellen der achten Passage wurde wesentlich mehr Matrix gebildet, die Unterschiede in der G/D-Relation waren jedoch nur marginal, abgesehen vom Verhältnis bei Zugabe von 0,2 ng PDGF, das bei der achten Passage erhöht war (Abbildung 31). Die Zugabe von PDGF führte zu einem uneinheitlichen Bild: Bei niedriger Konzentration wurde die Matrixbildung zunächst stimuliert, mit steigender Konzentration aber wieder gehemmt. In einer späten Passage führte die Zugabe einer geringen PDGF-Konzentration ebenfalls zu einer leichten Stimulierung der Matrixsynthese.

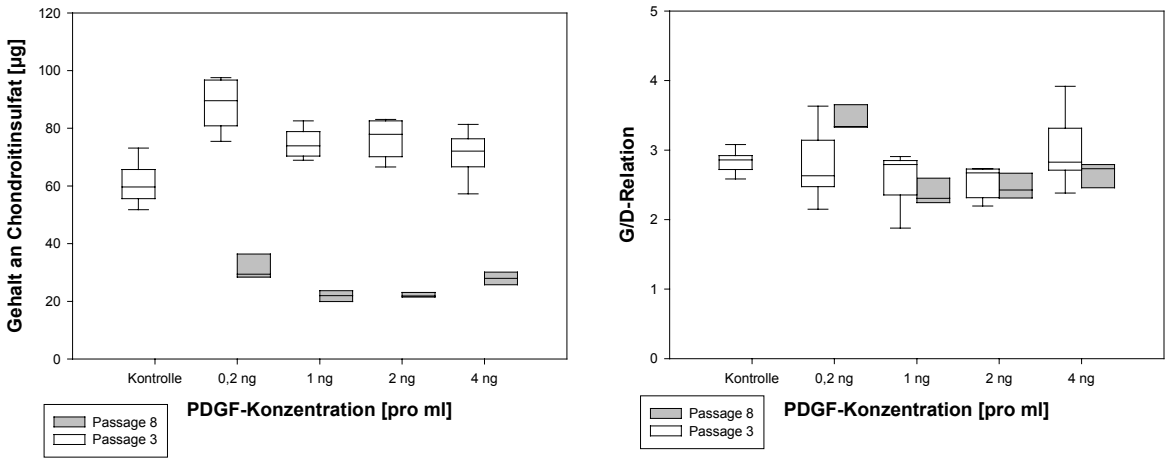


Abbildung 31: Einfluss der zugegebenen PDGF-Konzentration während der Redifferenzierung auf die Chondrone von Chondrozyten der achten Passage. Die Zellen wurden während der Alginatkultur mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (10 ng/ml) und den angegebenen Konzentrationen an PDGF-BB kultiviert. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte gegen die PDGF-Konzentration aufgetragen, in der rechten Grafik das G/D-Verhältnis. Kontrolle = 0 ng/ml PDGF-BB.

Bei der Kollagenbildung konnte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, bei Zellen der 8. Passage deutlicher als der 3. Passage. Nach Behandlung mit PDGF mit zunehmenden Konzentrationen stieg auch die Kollagen II-Synthese–in der Alginatphase (Abbildung 32). Dabei überwog der PDGF-Effekt auf den Kollagen II-Typ sogar den auf den Kollagen I Typ. Bei Zellen der 8. Passage nahm der Kollagen I-Gehalt sogar mit zunehmender Konzentration ab (Abbildung 32).

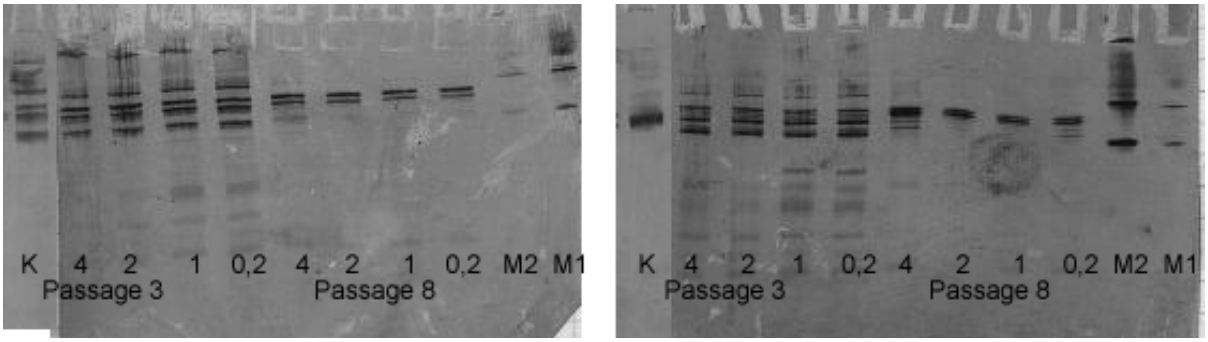


Abbildung 32: Kollagenbildung in einer frühen (P 3) und einer späten Passage (P 8) bei unterschiedlichen PDGF-Konzentrationen während der Redifferenzierung. Die Chondrozyten wurden mit IGF, TGF und den angegebenen PDGF-Konzentrationen [ng/ml] drei Wochen in Alginat kultiviert. K = Kontrolle (0 ng/ml PDGF). Kollagen I links, Kollagen II rechts.

Damit hat PDGF-BB also eher einen fördernden Einfluss auf die Redifferenzierung. Die Kollagen II-Synthese wird mit zunehmender Konzentration leicht stimuliert, die GAG-Synthese leicht gehemmt Interessanterweise wirkt sich dieser Faktor bei intensiv passagierten Zellen stärker aus als bei wenig passagierten.

3.6. Einfluss einer separaten Redifferenzierungsphase auf das Chondrogenesepotential von in vitro expandierten Chondrocyten

3.6.1. Effekt von reduziertem Sauerstoffpartialdruck und Wachstumsfaktoren auf Matrix-Syntheseraten in high-density-Kulturen nach Redifferenzierung

Bei der Suche nach geeigneten Kulturbedingungen für die Redifferenzierung der Chondrozyten ist ausschlaggebend, wie weit sich der Erfolg in der anschließenden Chondrogenese-Phase niederschlägt. Daher wurde in den im folgenden beschriebenen Experimenten der Anstieg der Matrixproduktion in der Chondrogenese-Phase unter dem Einfluss verschiedener Redifferenzierungsbedingungen untersucht.

In der ersten Versuchsreihe wurden Chondrozyten der achten Passage nach unterschiedlicher Redifferenzierungszeit und in Gegenwart unterschiedlicher Zytokin-Kombinationen sowie Sauerstoffpartialdrücken der Chondrogenese in drei-wöchigen high-density-Kulturen unterworfen. Die in Abbildung 33 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen kaum herausragende Unterschiede: Weder das Weglassen von TGF-β noch die Variation des Sauerstoffpartialdruckes scheinen sich signifikant auf die Knorpelbildung auszuwirken.

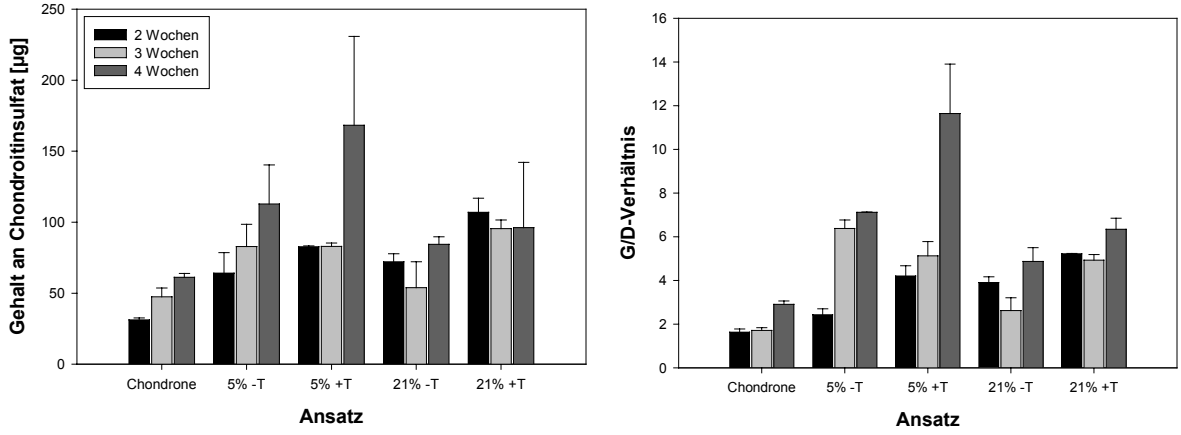


Abbildung 33: Einfluss der Verweildauer in Alginat auf die nach der Redifferenzierung unter unterschiedlichen Bedingungen weiterkultivierten Pellets.

Zellen der achten Passage waren bei 5 % O2 für 2, 3 oder 4 Wochen in Alginat und wurden danach bei den angegebenen Bedingungen 21 Tage weiterkultiviert. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte gegen die Kultivierungsbedingungen aufgetragen, in der Rechten die G/D-Relation. 5 %= 5 % O_2, 21 %= 21 % O_2; + T = Zugabe von IGF-I, TGF-β_1 und IL-4; -T = Zugabe von IGF-I und IL-4.

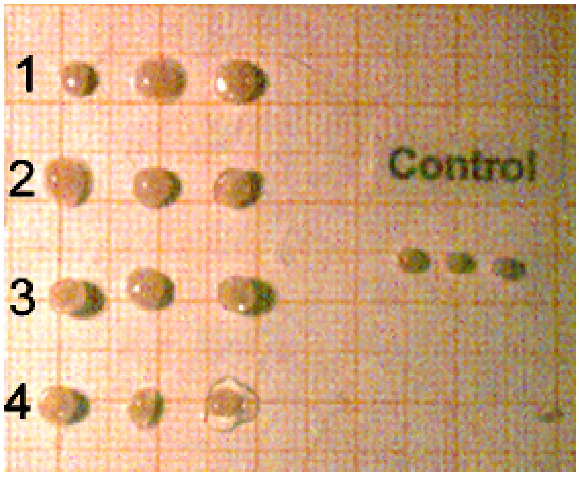


Abbildung 34: Ansicht der Pellets nach dreiwöchiger Kultivierung in Alginat bei unterschiedlichem Sauerstoffpartialdruck und mit verschiedenen Faktorenkombinationen. Die Pellets wurden drei Wochen in Alginat kultiviert und danach unter den gleichen Bedingungen drei Wochen zur Chondrogenese angeregt. 1 = 5 % O_2, IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (10 ng/ml), IL-4 (4 ng/ml); 2 = 5 % O_2, IGF-I, IL-4; 3 = 21 % O_2, IGF-I, TGF-β_1, IL-4; 4 = 21 % O_2, IGF-I, IL-4; Control = Kontrolle, ohne Faktoren, 21 % O_2.

Lediglich bei sehr langer Verweildauer in Alginat bringt die Kultivierung in Gegenwart von 5% Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase in Anwesenheit von IGF-I, TGF- β und IL-4 leichte Vorteile für die spätere Chondrogeneserate. Entsprechend wurden auch bei 21 % Sauerstoffpartialdruck und ohne die Zugabe von TGF- β die kleinsten Knorpelpellets gebildet, während sonst keine signifikanten Größenunterschiede zu verzeichnen waren (Abbildung 34).

Die zweite Versuchsreihe schließt neben der Variation des Sauerstoffpartialdruckes und der Zugabe von Interleukin auch einen Vergleich mit der Produktionsleistung von high-density-Kulturen ohne Einschub der Redifferenzierungsphase mit ein.
Für alle Ansätze wurden Chondrozyten der achten Passage aus dem selben Proliferationsansatz verwendet. Zur Redifferenzierung wurde ein Teil der Zellen zunächst in Alginat-Gel eingebettet und für drei Wochen kultiviert. Die so redifferenzierten Zellen wurden dann parallel mit unbehandelten anschließend wieder einer dreiwöchigen high-density-Kultur alternativ bei 5 % oder 21% Sauerstoffpartialdruck unterworfen. Zu allen Ansätzen wurde entweder eine Kombination aus IGF und TGF oder aus IGF, TGF und IL-4 zugegeben. Das in Abbildung 35 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die GAG-Produktion *der in vitro* expandierten Chondrozyten in hohem Maße von der Redifferenzierungsphase profitierte. Besonders eklatant wirkt sich dieser Effekt aus, wenn während der Alginatphase Interleukin-4 zugegeben und der Sauerstoffpartialdruck auf 5 % reduziert wurde.

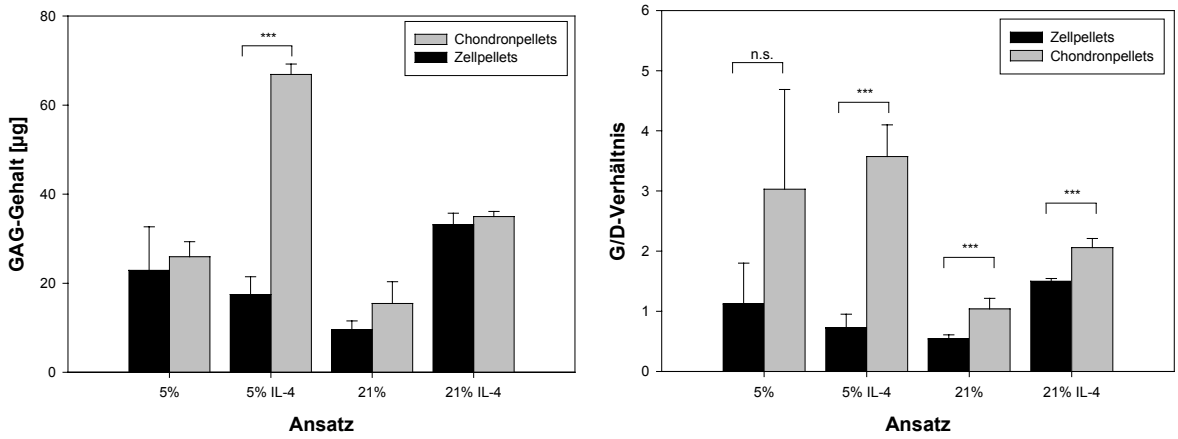


Abbildung 35: Vergleich der Chondrogeneseraten von *high density*-Kulturen mit und ohne Redifferenzierung in Alginatkultur. Ergebnisse ohne Redifferenzierung sind durch schwarze Balken dargestellt („Zellpellets“), solche mit vorheriger Redifferenzierung in Alginatkultur („Chondronpellets“) durch graue Balken repräsentiert. Alle Ansätze wurden mit IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (10 ng/ml) supplementiert ein Teil zusätzlich mit IL-4 (2 ng/ml) bzw bei 5 oder 21 % O_2-Partialdruck in der Gasphase behandelt. Die Klammern zeigen einen statistischen Vergleich zwischen Ansätzen an; Signifikanzniveau: n.s.=nicht signifikant, ***=p<0,001.

Die Unterschiede wurden bei den G/D-Verhältnissen wesentlich offensichtlicher. So waren bei drei Ansätzen signifikante Unterschiede feststellbar (t-test; IL 5: T=-8,67, D.F.=6, p<0,001; IT 21: T=-4,56, D.F.=6, p<0,001 und IL 21: T=-6,15, D.F.=6, p<0,001). Bei IT 5 ist zwar die Tendenz erkennbar, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die G/D-Verhältnisse bei den Pellets aus Chondronen lagen wesentlich höher als die der high-density-Kulturen aus Zellen. Diese Unterschiede zeigten sich auch deutlich im histologischen Vergleich (Abbildung 36).

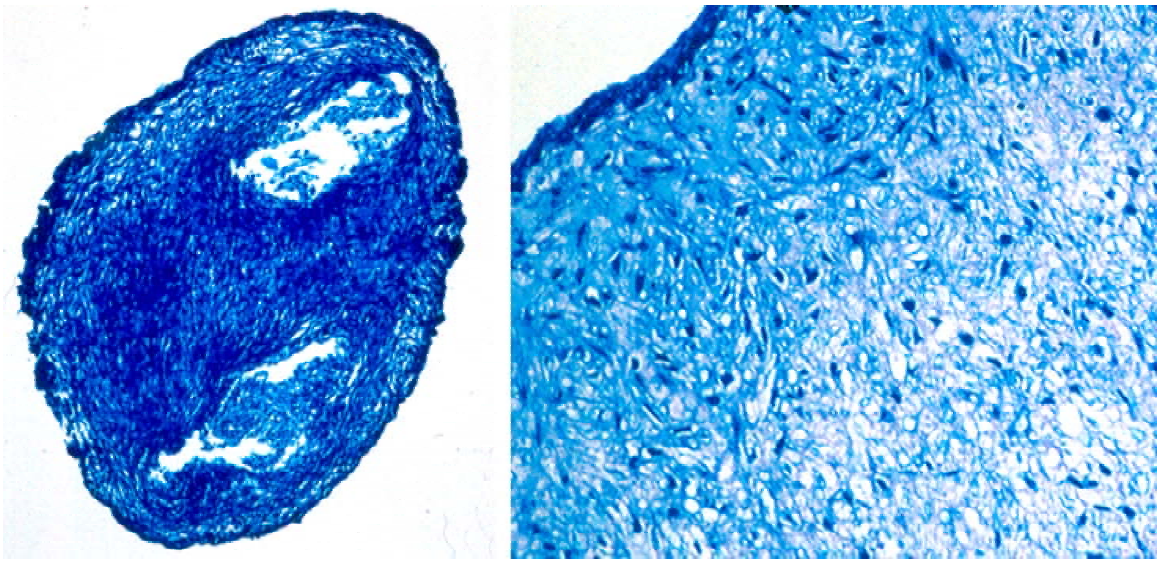


Abbildung 36: Vergleich der Matrixbildung beim 2-Phasen (linkes Bild) und 3-Phasen-System (rechts). Ohne Redifferenzierung wurde in den high-density-Pellets kaum Matrix gebildet, das entstandene Gewebe ist amorph, wohingegen bei den in Alginat vorbehandelten Zellen Matrix sezerniert wurde. Die Zellen wurden bei 21 % Sauerstoff mit IGF-I und TGF-β_1 kultiviert. Die Chondrozyten im rechten Bild wurden zwei Wochen in Alginat vorkultiviert. Toluidinblau-Färbung, linkes Bild 100x, rechtes Bild 200x.

Damit werden folgende Vorstellungen bestätigt: Die Redifferenzierungsphase macht einen bisher dedifferenzierten Teil der Zellpopulation offensichtlich für die Chondrogenese zugänglich. Die Sauerstoffreduktion scheint ein Differenzierungssignal darzustellen.
Neben IGF-I scheinen auch TGF-ß und Interleukin-4 positive Effekte auf die Matrixsynthese auszuüben. Die signifikante Erhöhung des Chondrogenesepotentials wird auch visuell in histologischen Schnitten an der Deponierung von interzellulärer Matrix deutlich.

3.6.2. Anpassung der Kulturbedingungen an die unterschiedlichen Aufgaben der Chondrozyten während der Redifferenzierungs- und Chondrogenese-Phase (Phase 2 und Phase 3)

Die Begünstigung der Redifferenzierung durch Reduzierung des Sauerstoffgehaltes in der Gasphase wurde bereits mehrfach belegt. Andererseits hat der in Kapitel 3.6.1 beschriebene Versuch gezeigt, dass Chondrozyten ohne Redifferenzierung bei höherem Sauerstoffpartialdruck auch höhere GAG-Syntheseraten erreichen. Das bedeutet, dass unterschiedliche zelluläre Funktionen wie Differenzierung und Matrixsynthese nicht optimal mit konstanten Gewebekultur-Bedingungen unterstützt werden können. Daher soll mit den im folgenden beschriebenen Experimenten demonstriert werden, in wie weit die individuelle Anpassung der Kulturbedingungen an die spezifischen zellulären Leistungen der drei Phasen Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese erfolgreich ist. Als erstes Beispiel wird untersucht, wie sich eine Redifferenzierung bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck mit darauf folgender Chondroneogenese bei 21 % Sauerstoffpartialdruck auswirkt.

Im konkreten Fall wurden Zellen in Gegenwart von bFGF proliferierte Chondrozyten der achten Passage für 3 Wochen bei 5 % O_2 und in Gegenwart von IGF-I und TGF-ß im Alginat-Gel redifferenziert und für weitere drei Wochen bei 21 % O_2 unter Zugabe von IGF-I, TGF-ß und IL-4 in high-density-Kultur zur Chondrogenese angeregt. In einem parallelen Kontrollansatz wurde die Redifferenzierungsphase weggelassen.

Das in Abbildung 37 dargestellte Ergebnis zeigt, dass Chondrozyten um einen Faktor fünf mal mehr an Proteoglykanen produzierten, wenn die Zellen die Redifferenzierungsphase durchliefen. Die Unterschiede im G/D-Verhältnis waren signifikant (t-test, t=-12,431, D.F.=8, P<0,001, n=10). Die absolute GAG-Menge lag noch höher als wenn die Zellen während der Redifferenzierung und der Chondrogenese konstant bei 5 % Sauerstoffpartialdruck kultiviert wurden (5 % = 71 ng GAG/Pellet; 5 % $\rightarrow$ 21 % = 105 ng GAG/Pellet, vgl. mit Abbildung 35).

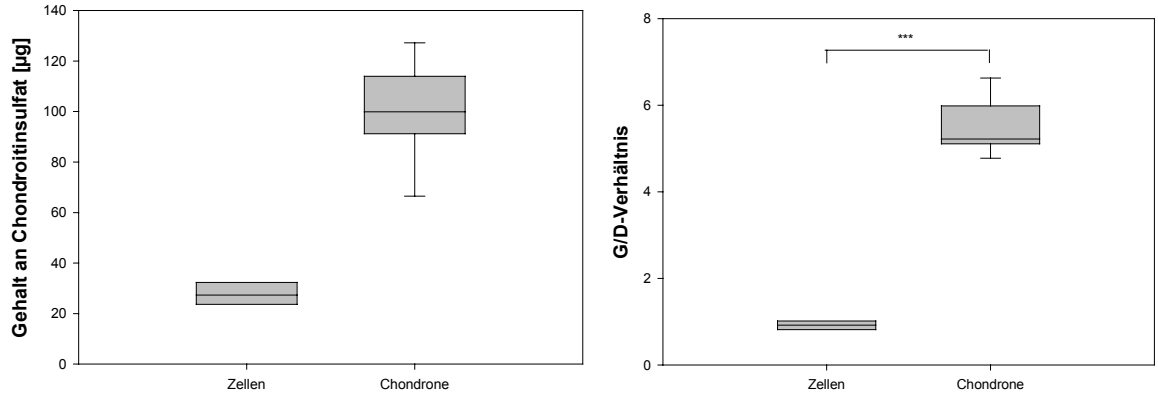


Abbildung 37: Unterschiede in der Matrixbildung in high-density-Kulturen mit und ohne Alginat-Phase. Zellen der achten Passage (hCh 8) wurden drei Wochen mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (100 ng/ml) und IL-4 (2 ng/ml) und bei 21 % O_2 als high-density-Kultur gefahren, entweder mit („Chondrone“) oder ohne („Zellen“) verhergehende dreiwöchige Redifferenzierung in Alginat in Gegenwart von IGF und TGF bei 5 % O_2-Partialdruck. In der linken Abbildung sind die absoluten GAG-Werte, in der rechten die G/D-Quotienten aufgetragen. Die Klammer zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Pellets an ($p<0,001$).

In einem analogen Versuch wurde mit Zellen der achten Passage der spezifische Effekt verschiedener weitererer Wachstumsfaktor-Kombinationen untersucht. Zum Vergleich wurde wieder jeweils eine high-density-Kultur (3 Wochen bei 21 % Sauerstoffpartialdruck) mit und ohne vorhergehende Redifferenzierungsphase im Alginat-Gel (3 Wochen bei 5 % Sauerstoffpartialdruck) durchgeführt. Bei beiden Ansätzen wurde mit der selben Startzellzahl (5×10^5 Chondrozyten bzw. Pseudochondrone) begonnen.

Bei allen Ansätzen mit Redifferenzierung wurde ein absolut höherer GAG-Gehalt beobachtet. Unabhängig von den Faktorenkombinationen war das G/D-Verhältnis stets signifikant höher als bei Pellets aus der HD-Kultur (t-Test). Die Werte sind in Tabelle 6 dargestellt. Der absolute GAG-Gehalt war um einen Faktor 3,9 (PIT IL-4) bis 15,4 (Kontrolle) mal höher, wenn die Zellen im dreiphasigen System kultiviert wurden (Abbildung 38).

Damit wird bestätigt, dass die gezielte Stimulierung der zeitlich voneinander getrennten beiden Phasen der Redifferenzierung und Matrixsynthese Vorteile bietet. Die Wahl des reduzierten Sauerstoffpartialdrucks zusammen mit IGF-I und TGF-β in der Redifferenzierungsphase einerseits und die synergistische Kombination der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF-β und IL-4 andererseits in Gegenwart eines normalen Sauerstoffpartialdruckes ergibt sich aus den Ergebnissen der im vorangegangenen beschriebenen Versuche. Neu ist in diesem Zusammenhang die in der Chondrogenese-Phase hemmende Wirkung von PDGF-BB in Gegenwart von IL-4.

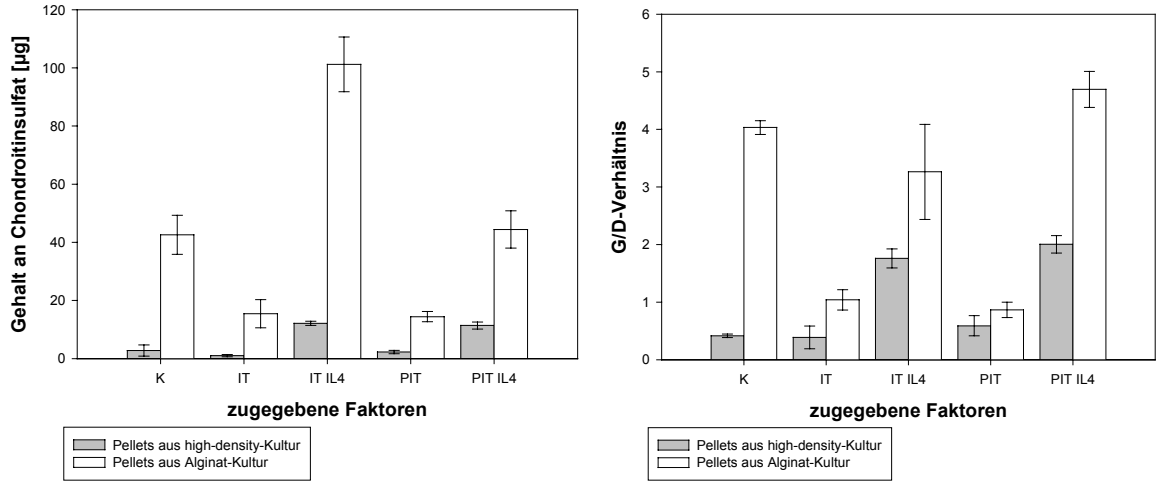


Abbildung 38: Unterschiede in der Matrixproduktion, abhängig von den Kultivierungsbedingungen. 5 x 10^5 Zellen der achten Passage (hCh 8) wurden entweder drei Wochen in high-density-Kultur mit den angegebenen Faktoren kultiviert, oder drei Wochen in Alginat und nach der Eluierung nochmals drei Wochen als HD-Kultur mit den Faktoren behandelt. In der linken Grafik sind die absolut gemessenen GAG-Werte, in der rechten die G/D-Relation aufgetragen. K=Kontrolle, ohne Faktoren; IT=IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (10 ng/ml); IT IL4=IGF-I, TGF-β_1 und IL-4 (4 ng/ml); PIT=PDGF-BB (4 ng/ml), IGF-I und TGF-β_1.

Tabelle 6: Werte des statistischen Vergleichs von Chondron- und Zellpellets. Angegeben sind die zugegebenen Faktoren, der t-Wert, die Freiheitsgrade (D.F.), das Signifikanzniveau (p), sowie die Probenanzahl (n).

Ansatz	t	D.F.	p	n
Kontrolle	-39,983	4	<0,001	6
IGF-I (100 ng/ml) TGF-β_1 (10 ng/ml)	-5,224	7	<0,01	9
IGF-I, TGF-β_1; IL-4 (4 ng/ml)	-3,570	6	<0,05	8
IGF-I; TGF-β_1; PDGF-BB (4 ng/ml)	-2,516	6	<0,05	8
IGF-I; TGF-β_1; IL-4; PDGF-BB	-15,527	6	<0,001	8

Die Bedingungen während der Redifferenzierung und der Chondroneogenese unterscheiden sich. Während sich ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck in der Alginatphase positiv auswirkt, werden die besten Ergebnisse für die Chondrogenese bei 21 % O_2 erzielt. Ein synergistischer Effekt von Redifferenzierung und Faktorenzugabe konnte beobachtet werden. Des weiteren wurde ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen IL-4 und PDGF-BB beobachtet, der sich in einer Hemmung der Matrixsynthese manifestiert.

3.6.3. Stimulation der Chondrogenese nach Unterstützung der Redifferenzierung durch TGF-β_1

Auf Grund der im vorigen Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden die folgenden Untersuchungen mit einer Redifferenzierungsphase bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck und der Chondroneogenese bei 21 % O_2 durchgeführt. Bei sonst identischen Versuchsbedingungen wurde lediglich die Konzentration von TGF-ß in der Redifferenzierungsphase variiert (vgl. Kapitel 3.5.3.2). Die Pseudochondrone wurden wie oben beschrieben eluiert, zentrifugiert und weitere drei Wochen mit IGF, TGF und IL-4 bei 21 % O_2 chondrogen stimuliert.

Die Analyse der Knorpelpellets nach 3 Wochen Chondroneogenese konnte indirekt einen deutlichen positiven Einfluss von TGF-ß auf die Redifferenzierung nachweisen. Mit zunehmender TGF-Konzentration stiegen sowohl der absolute GAG-Gehalt, wie auch die G/D-Relation der Pellets an (Abbildung 39).

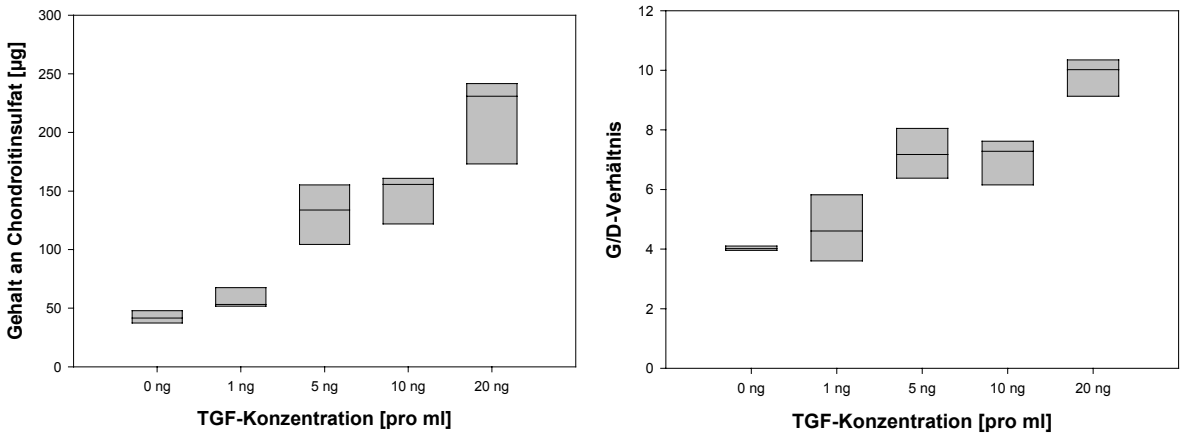


Abbildung 39: Einfluss der TGF-Konzentration während der Redifferenzierungsphase auf die Matrixbildung während der Chondrogenese. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte dargestellt, die rechte zeigt die G/D-Relation. Die Zellen wurden mit IGF-I (100 ng/ml) und den angegebenen TGF-Konzentrationen drei Wochen bei 5 % O_2 in Alginat redifferenziert. Danach wurden alle Ansätze bei 21 % O_2 mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (10 ng/ml) und IL-4 (2 ng/ml) drei Wochen als Pellets weiterkultiviert.

Die lineare Regression der Abhängigkeit des G/D-Verhältnisses in der Chondrogenese von der TGF-ß-Konzentration während der Redifferenzierung liefert noch einen weiteren interessanten Hinweis (Abbildung 40, Lineare Regression, R^2=0,747, p<0,001, n=19).

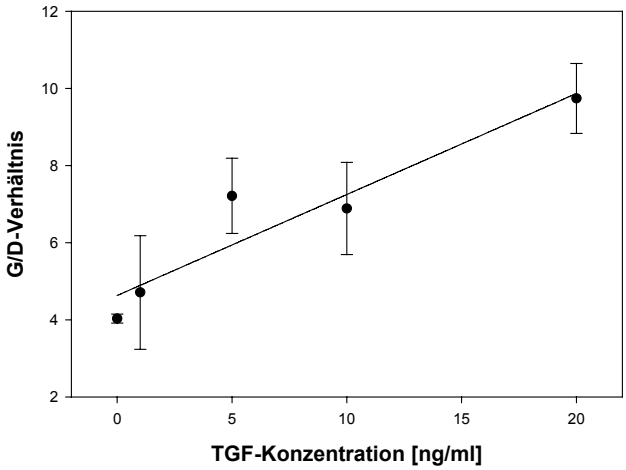


Abbildung 40: Regression des G/D-Verhältnisses der Pellets gegen die TGF-Konzentration. Die lineare Regression zeigt einen Zusammenhang zwischen der TGF-Konzentration während der Redifferenzierung und dem G/D-Verhältnis. Mit zunehmender Konzentration nahm das G/D-Verhältnis zu. R=0,864; R^2 =0,747; p<0,001; n=19; Regressionsgleichung: G/D=4,6325 + (0,2618 * Konz.)

Da der hier beobachtete TGF-ß-Effekt einer indirekten Steigerung der zellulären GAG-Syntheseleistung entspricht, liegt die Annahme nahe, dass TGF-ß mit zunehmender Konzentration einen wachsenden Anteil der anfangs überwiegend dedifferenzierten Zellen zur GAG-Synthese befähigt.

Die deutlichen Unterschiede in der gebildeten GAG-Menge schlagen sich nicht in gleichem Maße in unterschiedlicher Größe der gebildeten Pellets nieder (Abbildung 41). Beim Gewicht der Pellets waren nur Unterschiede zwischen der Kontrolle (8,7 mg) und der Konzentration von 1 ng (11,5 mg) gegenüber den anderen Konzentrationen, deren Mittelwert zwischen 18,33 und 18,5 mg lag, feststellbar.

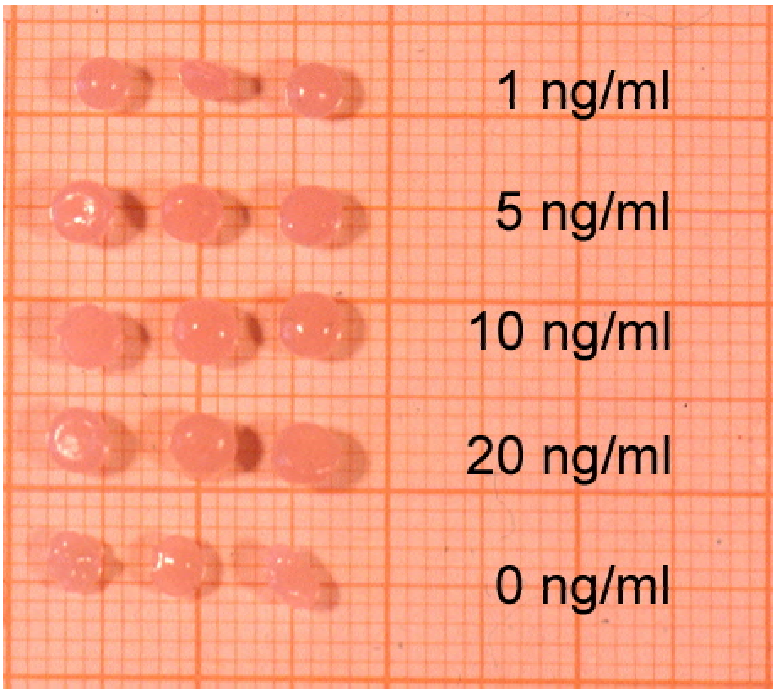


Abbildung 41: Ansicht der gebildeten Pellets bei unterschiedlicher TGF-Supplementierung während der Redifferenzierung. Die Pellets bei niedrigen Konzentrationen (0 ng = Kontrolle und 1 ng/ml) sind etwas kleiner als die bei den höheren Konzentrationen.

Die Kollagenanalyse bestätigte, dass verbesserte Redifferenzierungsbedingungen auch das Chondrogenesepotential der Chondrozyten günstig beeinflussen. Die Konzentrationszunahme von TGF-β_1 während der Redifferenzierung führte bei Analyse der Knorpelpellets zu deutlicher ausgebildeten Banden. Neben dem quantitativen Aspekt erscheint hier auch die Beobachtung erwähnenswert, dass ohne TGF-β-Zusatz überwiegend unreifes Prokollagen gebildet wird, während 20 ng/ml TGF-β im selben Zeitraum die Bildung bereits fertiger Kollagenmoleküle des Typs II fördert wie man aus der Ausbildung der sehr distinkt ausgeprägten Kollagen II-Banden schließen kann. Der Kollagen I-Gehalt war zwar bei allen Ansätzen relativ hoch, allerdings zeichnet sich eher eine negative Korrelation zwischen dem Kollagen I-Gehaltes und der TGF-β-Konzentration ab (Abbildung 42). Dies ist als Hinweis darauf zu verstehen, dass die Synthese beider Kollagentypen in diesem System unterschiedlich reguliert wird.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass sowohl die Synthese von Glykosaminoglykanen als auch die des Kollagen Typs II von einer hohen TGF-β-Konzentration in der Alginatphase profitieren. Es bestätigt die Vorstellung, dass sich die Chondrogenese indirekt durch Förderung der Redifferenzierung der Chondrozyten positiv beeinflussen lässt.

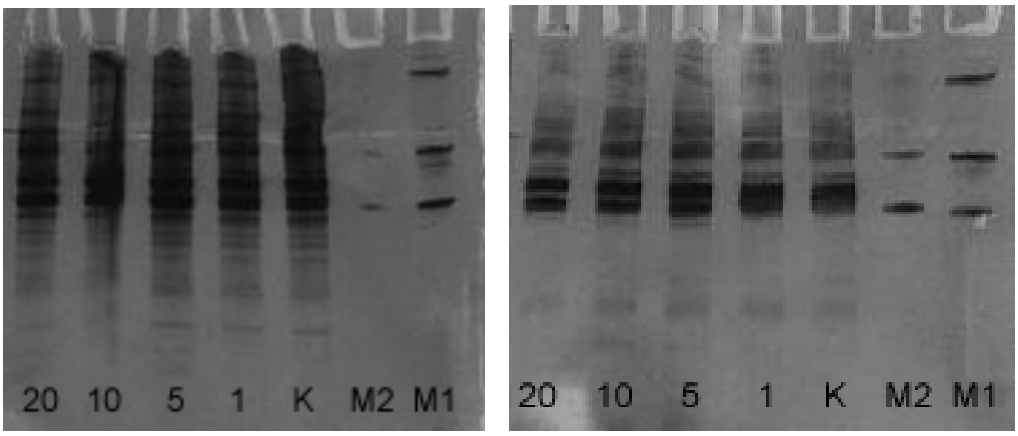


Abbildung 42: Einfluss der TGF-Konzentration während der Redifferenzierungsphase auf die Kollagenbildung während der Chondrogenese. Die Chondrozyten wurden mit IGF-I (100 ng/ml) und den angegebenen TGF-Konzentrationen [ng/ml] drei Wochen bei 5 % O_2 in Alginat redifferenziert. Danach wurden alle Ansätze bei 21 % O_2 mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (10 ng/ml) und IL-4 (2 ng/ml) drei Wochen als Pellets weiterkultiviert. Linke Grafik: Kollagen I, rechte Grafik: Kollagen II.

Dieser Einfluss wurde in der Immunhistochemie ebenfalls deutlich. Im Kontrollpellet war eine hohe Zellzahl im Verhältnis zur gebildeten Matrix zu beobachten, die Zellen lagen sehr dicht beieinander. Die Anfärbung auf Kollagen II war hauptsächlich in den Bereichen positiv, in denen sich kleinere Matrixinseln gebildet hatten. Kollagen I war diffus im ganzen Gewebe verteilt, trat aber im Randbereich sehr konzentriert auf (Abbildung 43).

Bei einer TGF-Konzentration von 5 ng/ml lagen die Zellen wesentlich weiter auseinander, ein Hinweis darauf, dass sie mehr Matrix gebildet hatten. Die Kollagen II-Konzentration war in der Mitte des Pellets am höchsten. Kollagen I wurde mehr als bei der Kontrolle gebildet. Die Bereiche, in denen Kollagen II nachgewiesen wurde, reagierten ebenfalls sehr stark positiv für den Kollagen-I-Antikörper. Zusätzlich wurde wiederum im Randbereich Kollagen I gebildet (Abbildung 44).

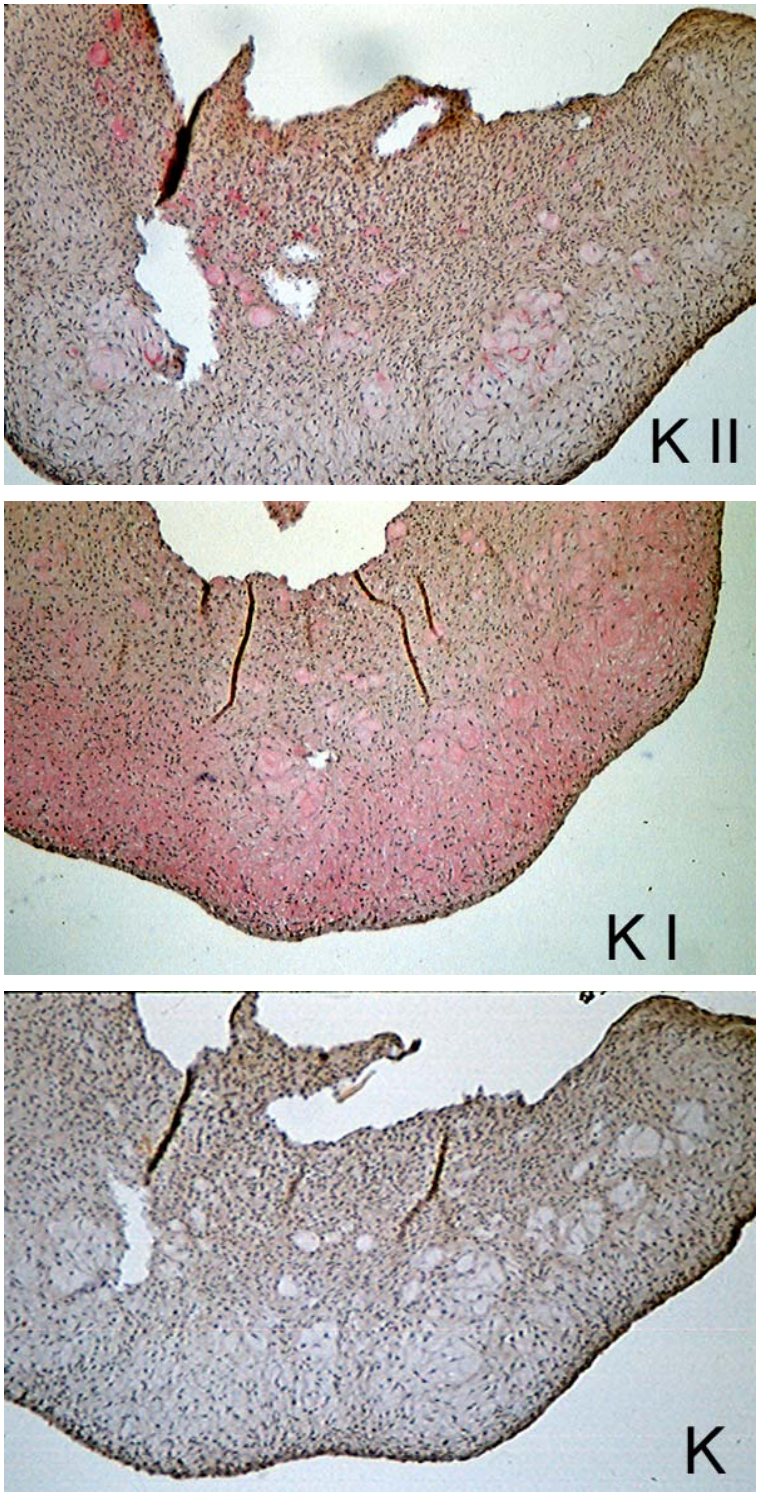


Abbildung 43: Immunhistochemie der Kontrollpellets (0 ng/ml TGF-β_1). Das Pellet zeichnete sich durch eine hohe Zellzahl aus. Die Zellen bildeten nur wenig Matrix. Es sind einige inselförmige Matrixbereiche erkennbar, in denen auch die Kollagen II (K II)-Färbung positiv war. Die Kollagen I-Färbung (K I) reagierte diffus im gesamten Gewebe verteilt positiv. Das unterste Bild zeigt die Negativkontrolle (K). 100fache Vergrößerung.

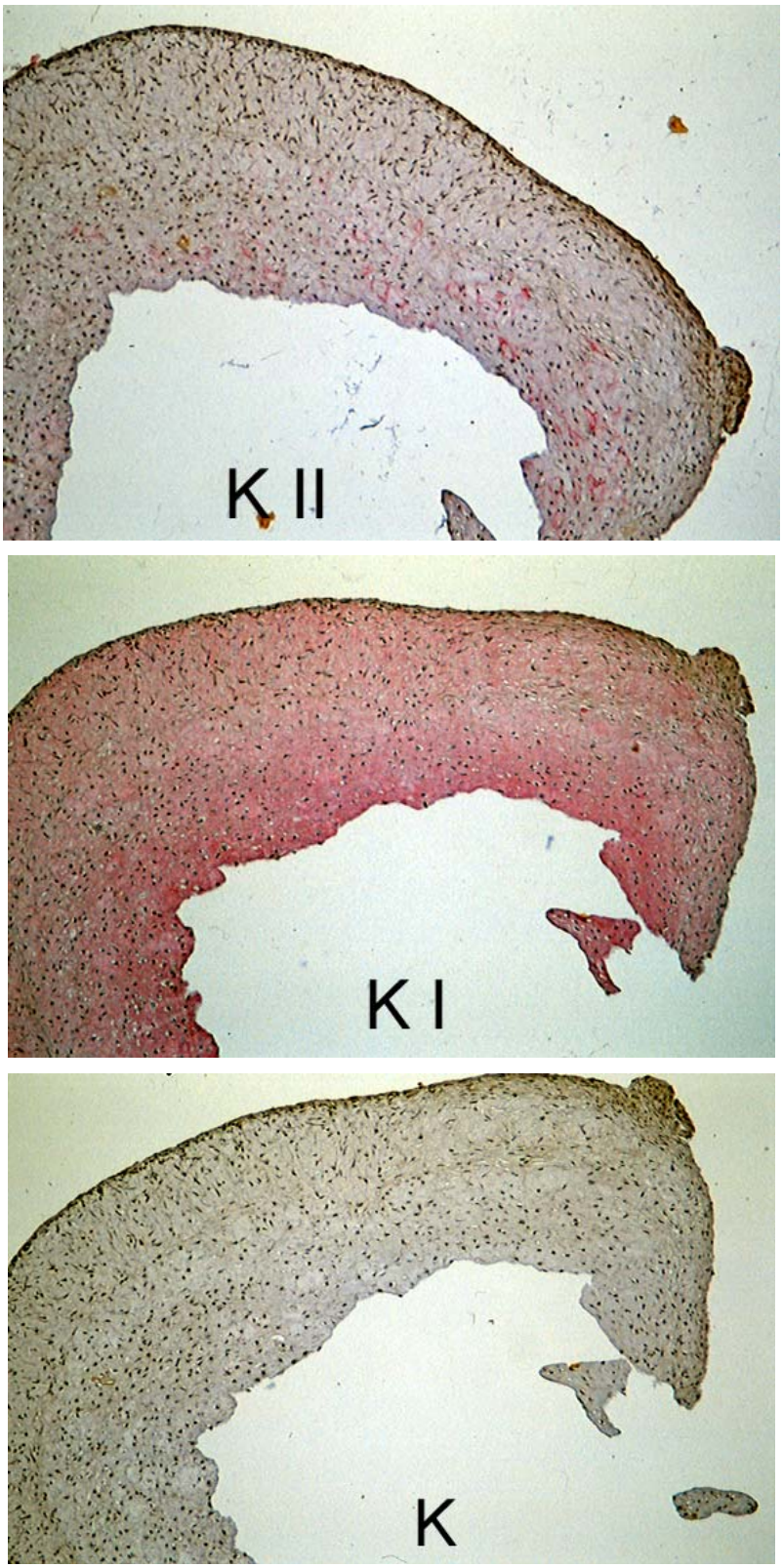


Abbildung 44: Immunhistochemie der Knorpelpellets (5 ng TGF-β_1). Die Zelldichte ist niedriger als bei der Kontrolle, die Matrixproduktion höher. Die Kollagen II-Bildung (K II) fand hauptsächlich in der Mitte des Pellets statt, dort war ebenfalls eine hohe Kollagen I-Bildung (K I) nachweisbar. Unteres Bild (K) = Negativkontrolle. 100fache Vergrößerung.

Die Zugabe einer hohen TGF-β_1-Konzentration während der Alginatphase bewirkt durch Redifferenzierung und Synchronisation des Differenzierungsgrades der gemischten Zellpopulation eine signifikante Stimulierung der Chondroneogenese. Im Gegensatz zur Redifferenzierung, während der in einigen Fällen die GAG- und Kollagensynthese entkoppelt zu sein scheint, sind die Syntheseraten während der Chondroneogenese positiv korreliert.

3.6.4. Indirekte Beeinflussung der Chondrogenese nach vorausgehender Stimulierung der Redifferenzierung durch PDGF-BB

Die Applikation von PDGF-BB während der Redifferenzierungsphase führte spontan zu einer leichten Stimulierung der Kollagen II- und einer Inhibierung der Matrixsynthese in den Pseudochondronen. Während der Chondrogenesephase wirkt es dem Effekt von IL-4 entgegen. Noch nicht untersucht wurde die Möglichkeit der indirekten Beeinflussung der Chondrogenese über die Modulierung der Redifferenzierung durch diesen Wachstumsfaktor.

Konzentrationsabhängigkeit

Die für die Redifferenzierung gezeigte konzentrationsabhängige Wirkung von PDGF-BB (Kapitel 3.5.4) konnte für die Chondrogenese bestätigt werden.

Die Chondrozyten der dritten und achten Passage, die während der Redifferenzierung mit konstanten IGF-I und TGF-β_1-Konzentrationen, aber unterschiedlichen PDGF-Konzentrationen kultiviert wurden, wurden weitere drei Wochen als high-density Pellets mit IGF, TGF und IL-4 zur Chondrogenese angeregt.

Hier waren je nach Passage unterschiedliche Ergebnisse festzustellen. Die Zugabe höherer PDGF-Konzentrationen während der Redifferenzierung führte bei Zellen der achten Passage zu einer Stimulierung der Matrixbildung. Der maximale Effekt wurde bei 4 ng/ml beobachtet. Im Vergleich zur GAG-Synthese während der Redifferenzierungsphase („Pseudo-Chondrone“) wurde um bis zu fünfmal mehr Chondroitinsulfat gebildet.

Bei Zellen der dritten Passage bewirkte die Erhöhung der PDGF-Konzentration nur bei niedrigen Konzentrationen eine leichte Zunahme der GAG-Synthese, um nach Überschreiten eines Maximums wieder abzunehmen. Bei den weniger stark dedifferenzierten Zellen der 3. Passage überwog also eine konzentrationsabhängige Inhibition der Chondrogenese (Abbildung 46).

Die makroskopische und histologische Untersuchung der gebildeten Matrix zeigte einige interessante Befunde (Abbildung 45). Im Inneren des gebildeten Knorpels waren gut ausgeprägte Chondrone zu finden, in den Randbereichen waren die Chondrozyten jedoch abgeflacht und gehäufter, also von weniger Matrix umgeben.

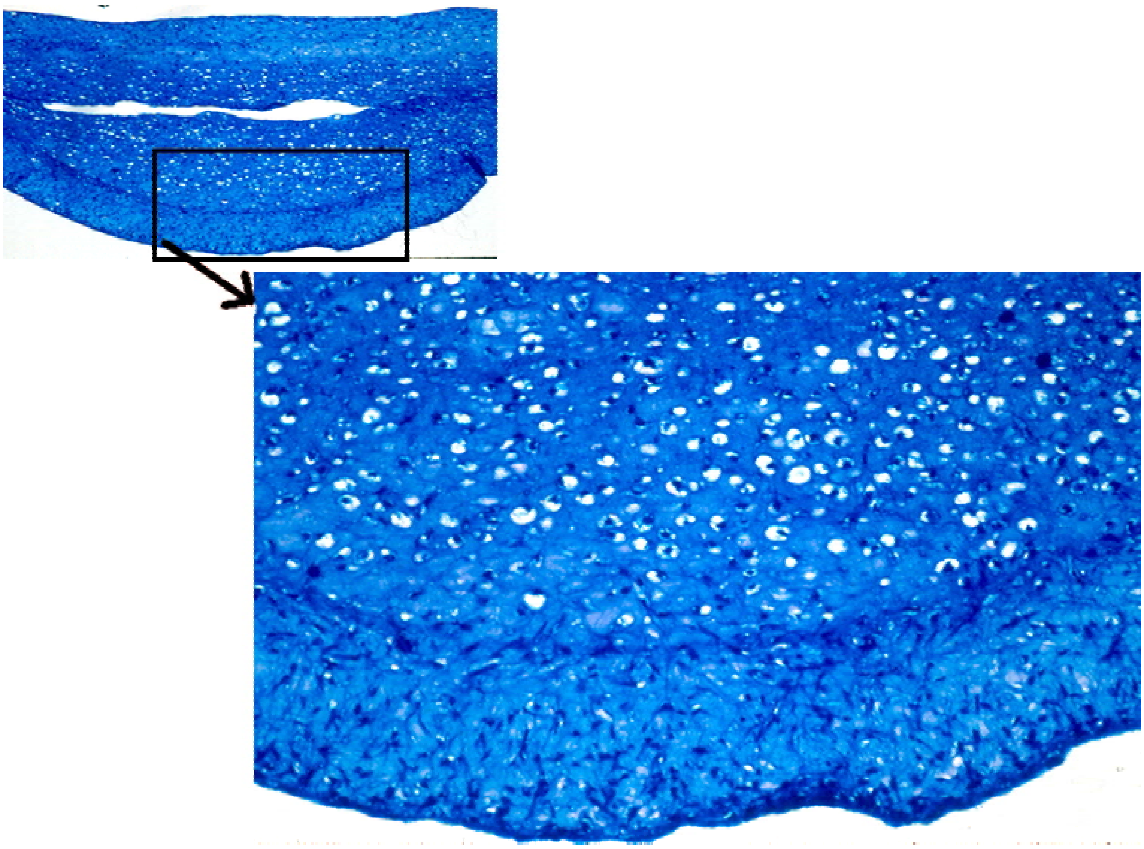
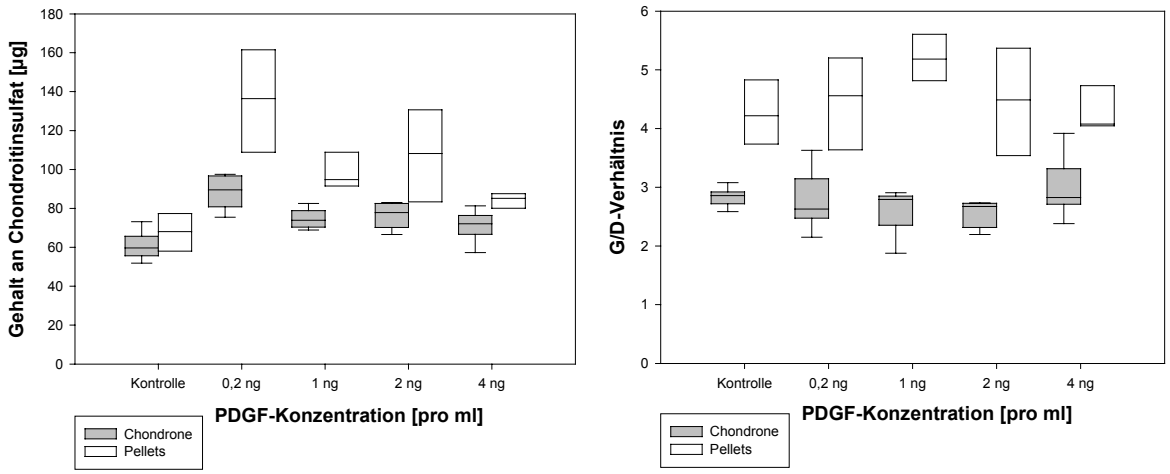


Abbildung 45: Matrixbildung bei Zugabe von 4 ng PDGF (achte Passage). Färbung mit Toluidinblau.

3. Passage



8. Passage

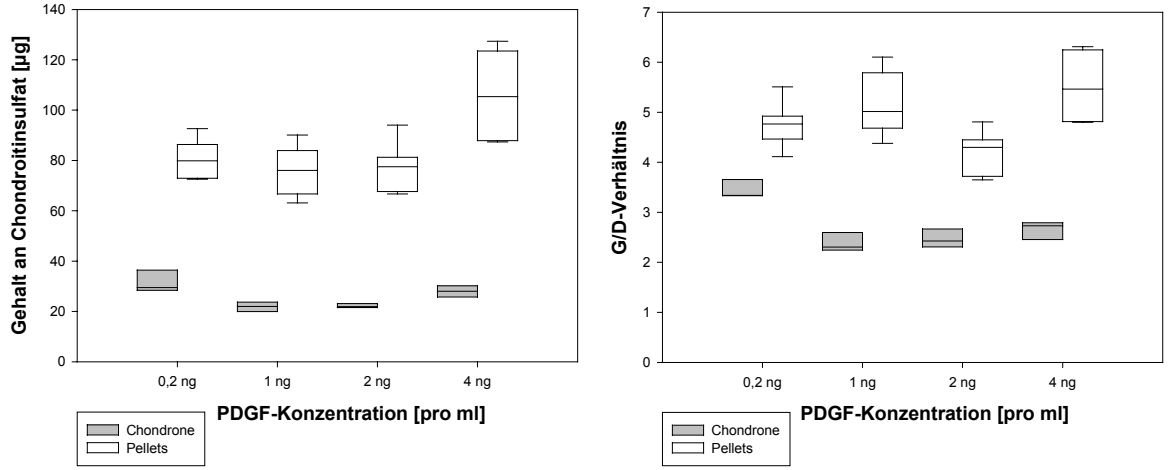


Abbildung 46: Einfluss der zugegebenen PDGF-Konzentration während der Redifferenzierung auf die Matrixbildung von Chondrozyten der dritten Passage (oben) und der achten Passage (unten) während der Redifferenzierungsphase (Chondrone) und der Chondrogenese (Pellets). Die Zellen wurden während der Alginatkultur mit IGF-I (100 ng/ml), TGF-β_1 (10 ng/ml) und den angegebenen Konzentrationen an PDGF-BB kultiviert. Die Kultivierung der high-density Pellets erfolgte mit IGF-I, TGF- β_1 und IL-4 (2 ng/ml). In der jeweils linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte gegen die PDGF-Konzentration aufgetragen, in der rechten Grafik das G/D-Verhältnis. Die Matrixsynthese der Pseudochondrone während der Redifferenzierungsphase wurde als Maß für die Matrixneusynthese während der Chondrogenese mit aufgenommen.

Im Gegensatz zur Bildung von Chondroitinsulfat konnte bei der Analyse der Kollagenbildung keine negative Korrelation bei Zellen der 3. Passage entdeckt werden. In den Pellets aus Zellen dieser frühen Passage wurde bei allen PDGF-Konzentrationen eine relativ große Menge Kollagen Typ II gefunden. Bei insgesamt sehr ausgeprägten Banden war noch eine leicht zunehmende Tendenz mit zunehmender Wachstumsfaktor-Konzentration zu

beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle wurden beide Kollagen-Typen in deutlich größerer Menge gebildet (Abbildung 47). In den Pellets aus Zellen der achten Passage wurde zwar deutlich weniger Kollagen Typ II gefunden, doch zeigte sich eine wesentlich deutlichere Konzentrationsabhängigkeit mit sehr distinkt ausgebildeten Banden bei 4 ng/ml PDGF-BB. Die Kollagen I-Bildung nahm mit zunehmender Konzentration ebenfalls zu (Abbildung 48). Diese Verhältnisse waren auch in den Immunhistologien nachweisbar (Abbildung 49)

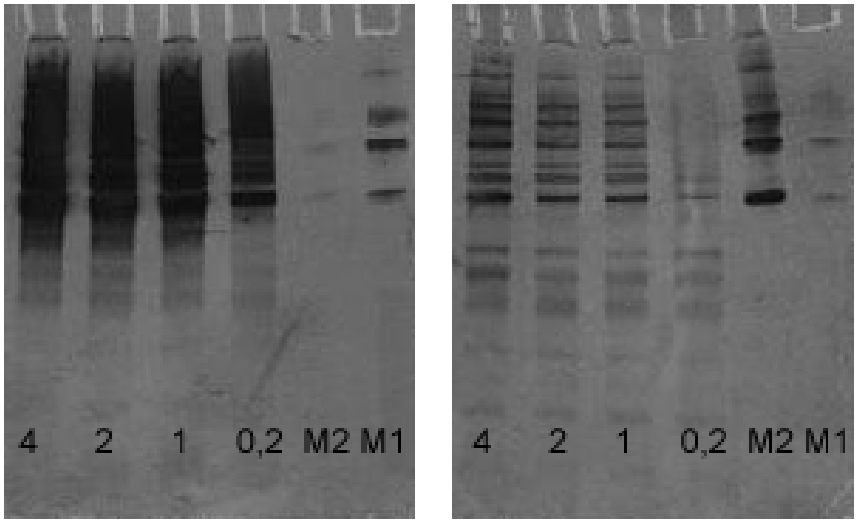


Abbildung 47: Konzentrationsabhängigkeit der Kollagenbildung in Pellets (P 8). Nach der Redifferenzierung, in der die angegebenen PDGF-Konzentrationen zugegeben worden waren, wurden die Pellets drei Wochen mit IGF, TGF und IL-4 weiterkultiviert. Links ist Kollagen I, rechts Kollagen II dargestellt.

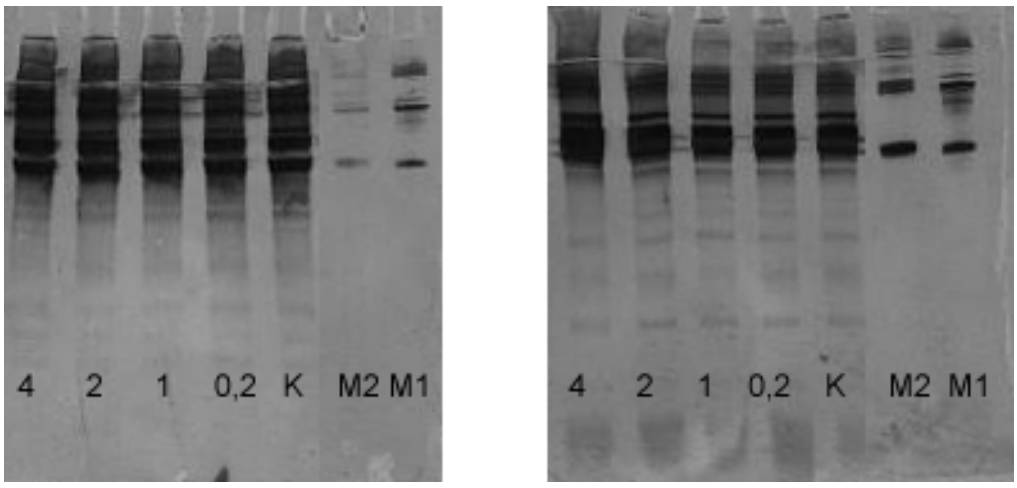


Abbildung 48: Konzentrationsabhängigkeit der Kollagenbildung in Pellets (P 3). Nach der Redifferenzierung, in der die angegebenen PDGF-Konzentrationen zugegeben worden waren, wurden die Pellets drei Wochen mit IGF, TGF und IL-4 weiterkultiviert. K = Kontrolle (ohne Zugabe von PDGF). Links ist der Kollagen I-, rechts der Kollagen II-Blot abgebildet.

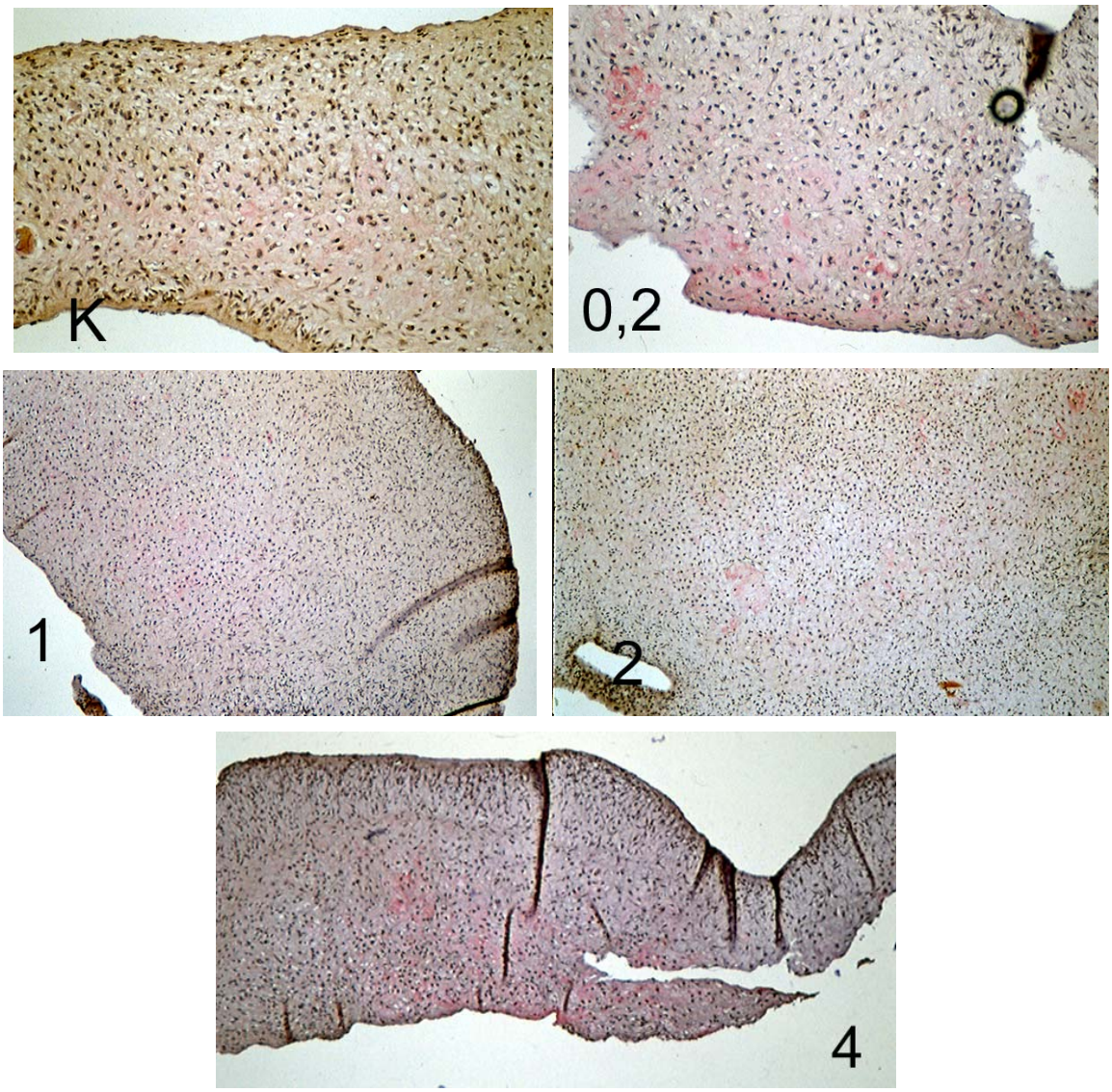


Abbildung 49: Kollagen II-Bildung in Abhängigkeit von der PDGF-Konzentration (Passage 8). Die gefärbten Bereiche (positiv für Kollagen II) nahmen mit zunehmender PDGF-BB-Konzentration [ng/ml] zu. Es war eine diffuse Verteilung im gesamten Gewebe zu beobachten. K = Kontrolle. Immunhistologische Färbung auf Kollagen II. K + 0,2: 200fache; 1, 2, + 4 100fache Vergrößerung.

Als Fazit dieser Versuche lassen sich die indirekten Effekte von PDGF wie folgt zusammenfassen: Während der Redifferenzierungsphase mit zunehmender Konzentration zugegeben führt dieser Wachstumsfaktor im Laufe der Chondroneogenese zu einer Zunahme der Kollagen Typ II-Synthese. In Bezug auf die Matrixsynthese wurden passagenabhängige Unterschiede festgestellt: In der achten Passage wurde die GAG-Synthese durch hohe Konzentrationen von PDGF während der Redifferenzierung, in der dritten Passage durch niedrige Konzentrationen maximal stimuliert. Die Neubildung der Matrix während der Chondroneogenese war in der späten Passage deutlich höher als in der frühen. Die Rolle von PDGF als Kompetenzfaktor wird besonders bei den intensiver passagierten und damit stärker dedifferenzierten Zellen erkennbar.

3.6.5. Direkte Beeinflussung der Chondrogenese nach vorausgehender Stimulierung der Redifferenzierung durch PDGF-BB

Wie der vorige Versuch zeigt, wirkte sich PDGF-BB bei stark dedifferenzierten Zellen nach der Modulierung der Redifferenzierung positiv auf die Kollagen II- und Matrixsynthese während der Chondroneogenese aus. Die direkte Beeinflussung der Chondrogenese durch diesen Wachstumsfaktor wurde noch nicht untersucht.

Zellen der achten Passage (hCh 8) wurden drei Wochen in Alginat bei 5% O_2 kultiviert und danach weitere drei Wochen als high-density-Pellets (5 x 10^5 Pseudochondrone) zur Chondrogenese angeregt. Es wurden während der Redifferenzierungsphase und der Chondrogenese unterschiedliche Faktorenkombinationen supplementiert: Kontrolle (ohne Faktoren); PDGF-BB (2 ng/ml); PDGF und IGF; PDGF und TGF; sowie PDGF, IGF und TGF. Die alleinige Zugabe von PDGF-BB führte zu den besten GAG-Werten, die Ansätze unterschieden sich aber nicht wesentlich voneinander. Im Verhältnis zur Kontrolle wurden leicht erhöhte Werte gemessen. Bei Betrachtung der G/D-Relation fällt auf, dass eine Supplementierung mit PDGF und TGF zusammen zu einer Abnahme des G/D-Verhältnisses führte. Die Kontrolle erreichte den höchsten Wert.

Wurde das PDGF jedoch nach der Redifferenzierung weiterhin zugegeben, schrumpften die Pellets und sowohl die GAG-Werte, als auch die G/D-Relation wurde signifikant schlechter. Bei der Kontrolle war dagegen eine Zunahme der Matrixproduktion sowohl im absoluten GAG-Gehalt, wie auch bei der G/D-Relation zu beobachten (Abbildung 50).

Der statistische Vergleich zwischen den G/D-Werten der Chondrone und Pellets der verschiedenen Ansätze zeigten eine signifikante Abnahme der Matrixbildung während der Chondrogenese (t-test, 7 D.F.): PDGF: $t=4,804$, $p<0,01$; P / I: $t=3,734$, $p<0,01$; P / T: $t=13,492$, $p<0,001$; P / I / T: $t=9,345$, $p<0,001$. Bei der Kontrolle war die Zunahme der Matrixbildung nicht signifikant. Die resultierenden Pellets, die mit PDGF behandelt wurden, hatten nach der Chondrogenese alle ein Gewicht <1mg und waren kleiner als 0,1 mm.

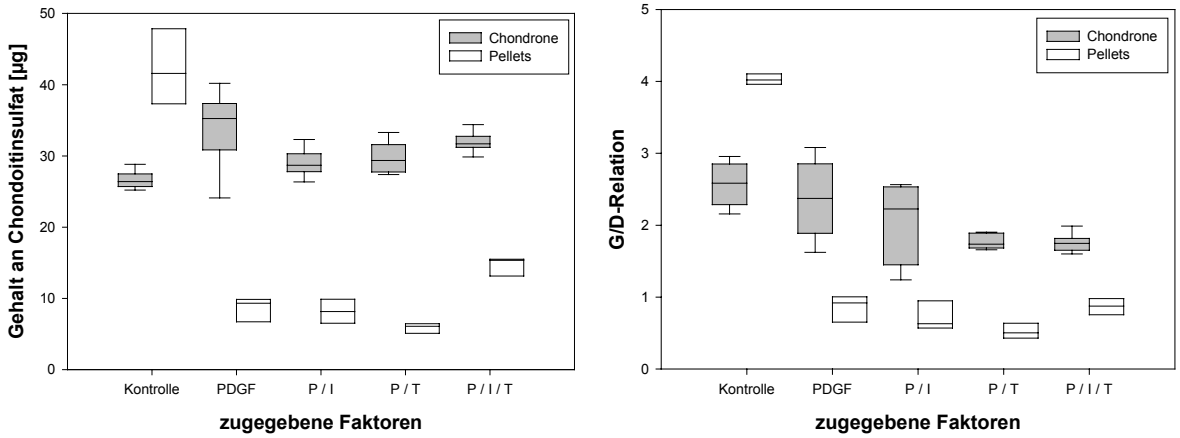


Abbildung 50: Einfluss von PDGF-BB auf die Matrixbildung bei Supplementierung in Phase 2 und 3. 5 x 10^5 Zellen wurden mit den angegebenen Faktorenkombinationen drei Wochen unter Redifferenzierungsbedingungen bei reduziertem O_2-Partialdruck und danach drei Wochen in HD-Kultur bei 21 % O_2 unter chondrogenen Bedingungen kultiviert. Kontrolle = ohne Faktoren, PDGF = Zugabe von 2 ng/ml PDGF-BB, P / I = Zugabe von PDGF-BB und IGF-I /(100 ng/ml), P / T = Zugabe von PDGF-BB und TGF-β_1 (10 ng/ml), P / I / T = Zugabe von PDGF-BB, IGF-I und TGF-β_1. In der linken Grafik sind die GAG-Gehalte, in der rechten die G/D-Verhältnisse aufgetragen. Chondrone = Pseudochondrone nach der Redifferenzierungsphase; Pellets = Knorpelgewebspellets nach der Chondroneogenese.

Auch die Kollagenanalyse zeigte, dass das während der Redifferenzierung gebildete Prokollagen II in den Pellets kaum noch vorhanden war, Kollagen I jedoch in hohem Maße gebildet wurde. Die Kombination von PDGF-BB mit IGF-I und TGF-β_1 führte zum höchsten Prokollagen II-Gehalt (Abbildung 51). Bei der Kontrolle war nur Kollagen I nachweisbar. Es fand also sowohl ein Abbau der Matrix, wie auch ein Abbau von Kollagen II statt.

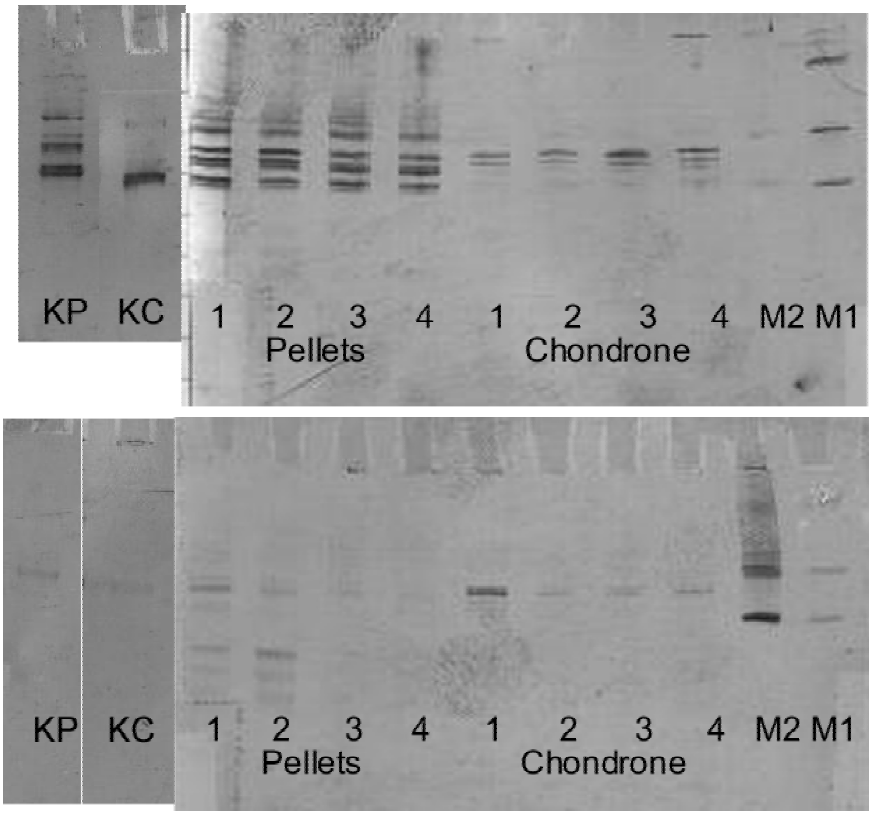


Abbildung 51: Einfluss der durchgängigen Supplementierung mit PDGF-BB auf die Kollagenbildung während der Redifferenzierung (Chondrone) und die Chondroneogenese (Pellets). Chondrozyten der achten Passage wurden mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen drei Wochen in Alginat kultiviert (Chondrone) und nach der Elution weitere drei Wochen zur Chondrogenese angeregt (Pellets). Zugegebene Faktoren waren 1= IGF, TGF und PDGF; 2 = TGF und PDGF; 3 = IGF und PDGF; 4 = PDGF; K = Kontrolle (C = Chondrone, P = Pellets). Der obere Blot zeigt die Kollagen I, der untere die Kollagen II-Bildung.

Die leichte Stimulierung der Kollagen II-Synthese und der GAG-Synthese während der Redifferenzierung durch Zugabe von PDGF wurde bestätigt. Wird dieser Wachstumsfaktor während der Chondroneogenese jedoch weiterhin zugegeben, wird die Degradation der gebildeten Matrix bzw. eine Inhibierung der Matrixneubildung induziert.

3.7. Erhöhung des Chondrogenesepotentials durch Interleukin-4 (IL-4)

3.7.1. Einfluss auf die Matrixsynthese

Auf einen positiven Einfluß von Interleukin-4 auf die Kollagen II- und Matrixsynthese während der Redifferenzierung der Chondrozyten wurde bereits in unterschiedlichen Zusammenhängen hingewiesen (z. B. Kapitel 3.5.3.1). Dabei blieb noch offen, ob der

fördernde Einfluss auf die Matrixsynthese während der Chondrogenesephase eher auf eine Unterstützung der Redifferenzierung zurückzuführen oder eine Folge der direkten Stimulierung der Nettosyntheseraten von Kollagen und Glykosaminoglykanen während der Chondrogenesephase ist. In Tabelle 7 sind all diejenigen Versuchsansätze aufgelistet, die bei unterschiedlichen Zielsetzungen doch gemeinsam eine Aussage hinsichtlich dieser Frage erlauben sollten. Es handelt sich um verschiedene Zellpräparationen, die unterschiedlich lange passagiert und unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen unterworfen wurden, um schließlich bei einem Sauerstoffpartialdruck von 21 % in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-4 zur Stimulierung der Chondrogenese in high-density-Kultur gehalten zu werden.

Tabelle 7: Übersicht über die Versuche mit Interleukin-4 bei 21 % O_2.

Zelllinie	Passage	Alginatdauer (Wochen)	Chondrogenesebedingungen; -dauer	Proben-anzahl
hCh 9	6	2	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	4
hCh 8	1	0	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	4
hCh 8	7	0	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	6
hCh 8	7	2	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	10
hCh 8	8	0	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	4
hCh 8	9	0	IGF-I, TGF-β_1, 21 % O_2; 21 d	8
hCh 8	9	0	IGF-I, TGF-β_1, PDGF 21% O_2; 21 d	8

Nach Vergleich der Ergebnisse lässt sich folgendes sagen: Bei einem Sauerstoffgehalt von 21 % hatte die Zugabe von IL-4 immer einen positiven Einfluss auf die Matrixproduktion. Dies ließ sich sowohl am absoluten Proteoglykangehalt, als auch an der G/D-Relation belegen (Abbildung 52). Weder die Variation der Anzahl der Passagen, der Zelllinie, noch die Entscheidung ob mit oder Alginatbehandlung bildeten eine Ausnahme. Die statistische Analyse ergab für die gemittelten G/D-Verhältnisse einen signifikanten Unterschied zugunsten der Interleukin-4-Zugabe (t-test: t=-6,773, D.F.=42, p<0,001). Zellen der ersten Passage bildeten am meisten Matrix, auch das G/D-Verhältnis war hier am höchsten. Danach war eine Abnahme der Matrixproduktion mit der Passagenzahl in Bezug auf die absoluten GAG-Werte zu beobachten, der sich beim G/D-Verhältnis jedoch nicht zeigen ließ. Die Zellen der siebten bis neunten Passage wiesen relativ ähnliche G/D-Relationen auf. Der Zuwachs an gebildeter Matrix gegenüber der Behandlung ohne IL-4, gemessen am Gehalt an Chondroitinsulfat, lag zwischen 1,5-fach bis 18,97-fach. Der Mittelwert lag bei einem Faktor von 4,92. Beim G/D-Verhältnis lag die Zunahme zwischen einem Faktor 1,007 und 8,85, bei einem Mittelwert von 3,01. Der Versuch mit hCh 9 Zellen sticht hervor, da sehr hohe GAG-Werte und eine gute G/D-Relation nachweisbar waren. Hier ist zu erwähnen, dass die Zellen nur zwei Wochen in Alginat vorbehandelt wurden.

Die Zugabe von Interleukin-4 führte in allen Fällen zu einer Stimulierung der Proteoglykansynthese.

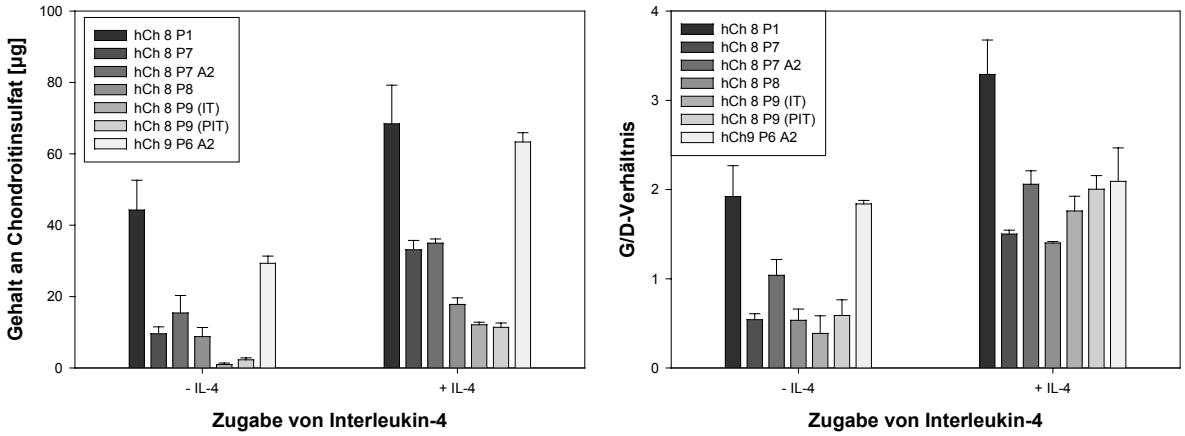


Abbildung 52: Einfluss der Zugabe von Interleukin auf die Matrixproduktion bei verschiedenen Zelllinien und Passagen. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte aufgetragen, in der rechten das G/D-Verhältnis. Eine Balkenfarbe repräsentiert einen Versuch. hCh: Zellpräparation (8 und 9); P: Ziffer =Passagenanzahl; A2 = 2 Wochen Verweildauer in Alginat, Buchstaben in Klammern bezeichnen unterschiedliche Faktorenkombinationen (vgl. Tabelle 7).

Zwei Versuche wurden bei verringertem Sauerstoffpartialdruck durchgeführt. Diese sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Bei den Versuchen mit 5 % Sauerstoff zeigten sich zwei gegenläufige Tendenzen, abhängig von der Vorbehandlung. Wurden Zellen bei 5 % kultiviert, so zeigte die Zugabe von Interleukin einen leicht negativen Effekt, wohingegen eine Vorbehandlung im Alginatsystem zu einer deutlichen Steigerung der Matrixproduktion führte, was als Folge der Redifferenzierung zu interpretieren ist (Abbildung 53).

Tabelle 8: Übersicht über die Versuche mit Interleukin-4 bei 5 % O_2.

Zelllinie	Passage	Alginatdauer (Wochen); O_2	Chondrogenesebedingungen; -dauer	Probenanzahl
hCh 8	7	0	IGF-I, TGF-ß, 5% O_2; 21 d	6
hCh 8	7	2	IGF-I, TGF-ß, 5% O_2; 21 d	10

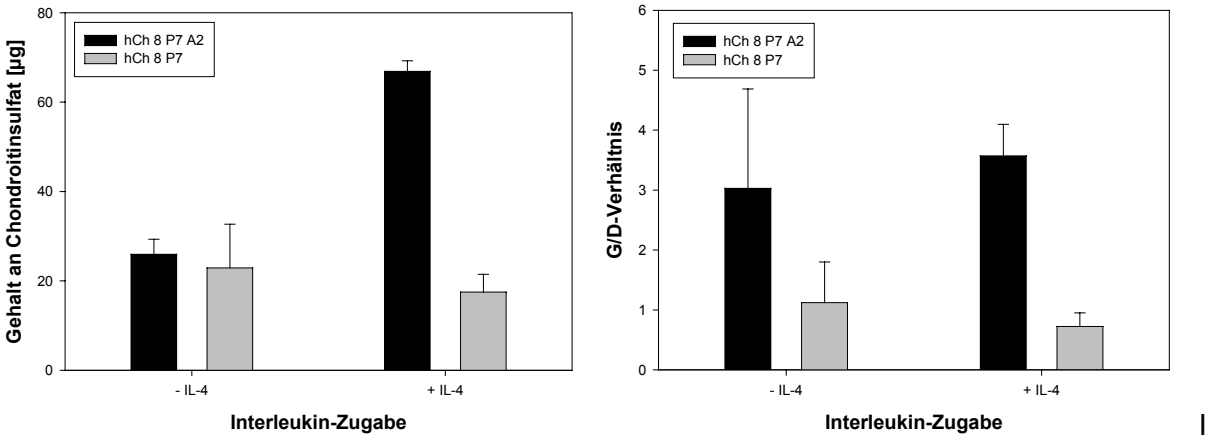


Abbildung 53: Einfluss der Zugabe von Interleukin auf die Matrixproduktion bei verschiedenen Zelllinien und Passagen. In der linken Grafik sind die absoluten GAG-Werte aufgetragen, in der rechten das G/D-Verhältnis. Eine Balkenfarbe repräsentiert einen Versuch. hCh: Zellpräparation (8); P: Passage; A: Verweildauer in Alginat (Wochen).

Die Reduzierung des Sauerstoffpartialdruckes während der Chondroneogenese führt nicht nur zu einem Verlust der Matrixsyntheserate, sondern auch zu einer Verminderung der stimulierenden Wirkung von Interleukin-4. Dieser Effekt kann bereits durch eine kurze Redifferenzierungsphase revertiert werden. Dies kann als Hinweis dafür verstanden werden, dass IL-4 zwar die laufende Chondrogenese unterstützt, sie aber offensichtlich nicht induzieren kann.

3.7.2. Einfluss auf die Kollagenproduktion

Der konzentrationsabhängige Einfluss von Interleukin auf die Kollagenproduktion während der Redifferenzierung konnte nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.3.1). Um einen Einfluss der Interleukin-4-Zugabe auf die Kollagensynthese während der Chondroneogenese zu untersuchen, wurden Zellen der achten Passage (hCh 8) 21 Tage mit IGF-I, TGF-β_1 und mit oder ohne IL-4 kultiviert, ohne eine vorherige Redifferenzierung. In diesem Fall (2-Phasen-System) war nur eine sehr schwache Ausprägung von Kollagen II-Banden zu beobachten, die tendenziell bei Interleukin-Zugabe zunahm. Der Gehalt an Kollagen I wurde durch die Zugabe von Interleukin jedoch reduziert (Abbildung 54).

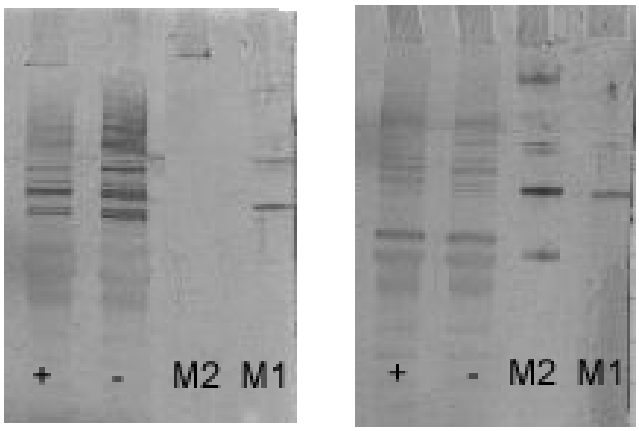


Abbildung 54: Kollagenbildung mit und ohne Interleukin-4. Zellen der achten Passage (hCh 8) wurden auf Biozement 3 Wochen lang mit IGF-I und TGF-β_1 (-) oder mit IGF, TGF und IL-4 (+) kultiviert. Linker Blot: K I, rechter Blot: K II.

Im Gegensatz zum deutlichen Einfluss auf die Matrixproduktion wurde die Kollagenbildung durch Interleukin-4 während der Chondrogenesephase nur in geringem Maße beeinflusst. Im 2-Phasen-System eine wurde eine Reduzierung der Kollagen I-Synthese festgestellt.

3.8. Darstellung der Komplexität des drei-Phasen-Systems und der unterschiedlichen Wirkung einer Faktorenzugabe am Beispiel von PDGF-BB

Gerade anhand des Beispiels von PDGF-BB konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Zugabe eines Faktors nicht zwingend in der Phase auswirkt, in der diese stattfindet. Auch eine Beeinflussung der Wirkungsweise anderer Zytokine ist bereits belegt. Daher sollte untersucht werden, ob sich durch eine Zugabe von PDGF ein Effekt erreichen lässt, der sich erst in einer späteren Phase manifestiert und wie sich diese in allen drei Phasen auswirkt.

3.8.1. Permissive Wirkungen von PDGF bei Applikation während der Proliferationsphase (Phase 1)

Eine Reihe der in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Ergebnisse sind unter dem permissiven Einfluss von PDGF zustandegekommen, bisher allerdings ausschließlich bei Einsatz in der Redifferenzierungs- und Chondrogenese-Phase. Als mitogener Wachstumsfaktor hat sich PDGF neben bFGF und Supplemetierung des Wachstumsmediums mit humanem Serum nicht behaupten können. Ein signifikanter Effekt auf die Proliferationsrate unter den Bedingungen der konventionellen Monolayerkultur konnte nicht entdeckt werden. Damit war allerdings noch nicht auszuschließen, dass PDGF ähnlich wie auch bFGF für die Knorpelbildung wichtige Eigenschaften der Chondrozyten indirekt fördern könnte. Um diese Möglichkeiten experimentell zu überprüfen, wurde eine Reihe von

Versuchen mit Zellen durchgeführt, die zuvor entweder allein mit bFGF oder mit einer Kombination aus bFGF und PDGF als mitogene Wachstumsfaktoren proliferiert worden waren. Da wie bereits weiter oben gezeigt kein mitogener Effekt nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2), konzentrierten sich die Untersuchungen auf mögliche Einflüsse auf Redifferenzierung und Chondrogenese.

3.8.1.1. Einfluss von PDGF im Wachstumsmedium auf GAG- und Kollagensynthese während der Redifferenzierungsphase

Im einzelnen wurden Zellen mit FGF (10 ng/ml) oder einer Kombination aus FGF und PDGF-BB (2 ng/ml) proliferiert, um sie zunächst für drei Wochen mit bewährten Faktorenkombinationen (ohne Faktoren; mit IGF-I und TGF-β_1; mit IGF, TGF und IL-4; mit IGF, TGF und PDGF-BB; mit IGF, TGF, PDGF und IL-4) und bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck in Alginat zu kultivieren.

Die unter den beiden unterschiedlichen Proliferationsbedingungen vermehrten Zellpräparationen zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Matrixbildung während der Redifferenzierungsphase. So bildeten die mit PDGF/FGF behandelten Zellen unter dem Einfluss fast aller applizierten Faktorenkombinationen in fast allen Fällen mehr Glykosaminoglykane (Abbildung 55). Besonders erwähnenswert ist, dass bereits in Abwesenheit aller Faktoren in der Alginatkultur (Kontrolle), etwa die ca. 2,5-fache Menge an Chondroitinsulfat gebildet wurde.

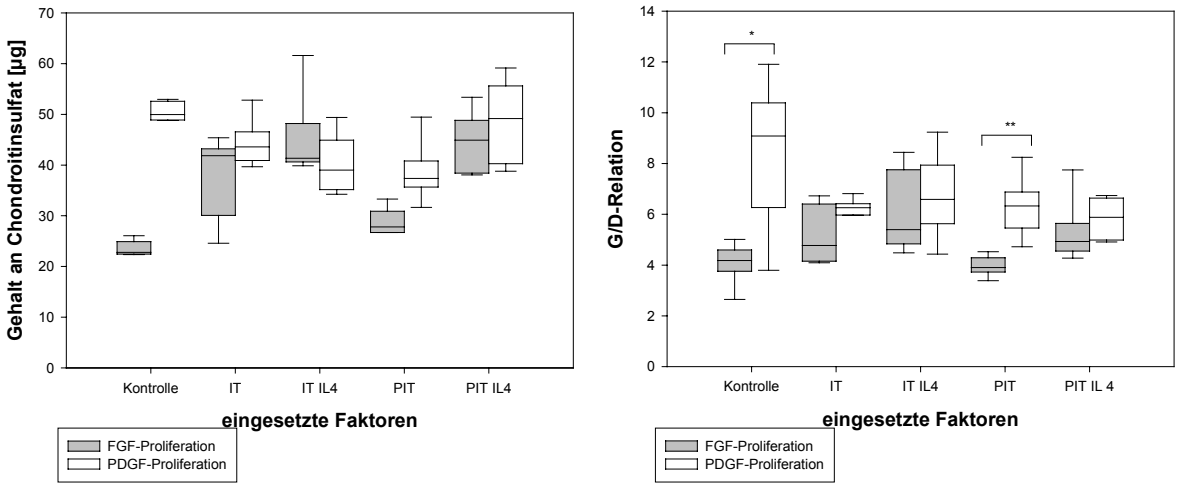


Abbildung 55: Einfluss der Proliferationsbedingungen auf die Matrixbildung während der Redifferenzierung. Die Zellen wurden entweder mit bFGF proliferiert (FGF-Proliferation), oder mit einer Kombination aus bFGF und PDGF-BB (PDGF-Proliferation) und mit verschiedenen Faktorenkombinationen redifferenziert. In der linken Grafik werden die absoluten GAG-Werte der Chondrone verglichen, in der rechten die G/D-Verhältnisse. Kontrolle: ohne Faktoren, IT: mit IGF-I und TGF-β_1, IT IL4: mit IGF, TGF und IL-4, PIT: mit IGF, TGF und PDGF-BB, PIT IL4: mit IGF, TGF, PDGF und IL-4). Die Klammern zeigen signifikante Unterschiede an (*=p<0,05; **=p<0,01).

Auch bei den G/D-Verhältnissen waren diese Unterschiede zu erkennen. Die Mittelwerte der mit PDGF/FGF vorbehandelten Zellen waren in allen Fällen höher als die der FGF proliferierten (Abbildung 55). Die Zugabe von PDGF während der Proliferation führte zu einer Erhöhung der Matrixproduktion während der Redifferenzierung. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Kontrolle (t-test: t= -2,984, D.F.=8, $p<0,05$) und bei der Behandlung mit PDGF, IGF und TGF (PIT, t-test: t= -3,841, D.F.=8, $p<0,01$).

Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich bei der Kollagen-Bildung. Während bei mit FGF proliferierten Zellen alle Ansätze außer der Kontrolle Kollagen I und II bildeten, konnte bei der FGF/PDGF-Proliferation nur bei den zwei Faktorenkombinationen, die ebenfalls PDGF enthielten (IGF, TGF, PDGF und IGF, TGF, PDGF, IL-4), Kollagen I/II nachgewiesen werden (Abbildung 56). Bei FGF-proliferierten Zellen wurde bei einer Faktorenkombination von PDGF, IGF und TGF am meisten Kollagen gebildet, bei der PDGF-Vorbehandlung führte die Kombination von IGF, TGF, IL-4 und PDGF zum höchsten Kollagen II-Gehalt.

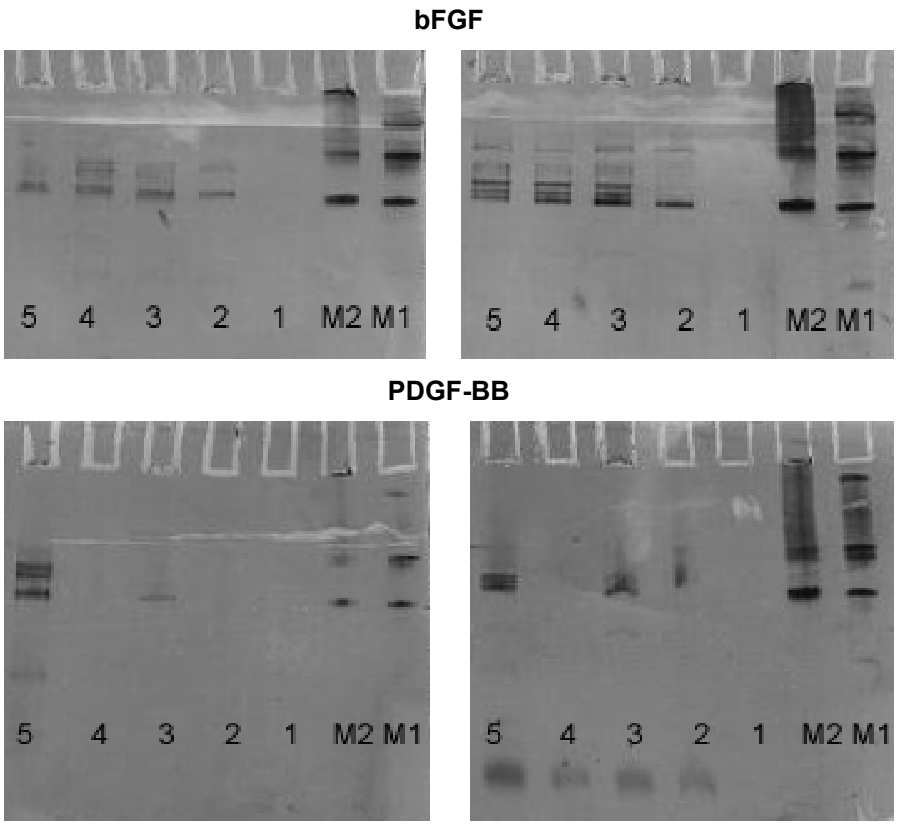


Abbildung 56: Abhängigkeit der Kollagenbildung während der Alginatphase von der Vorbehandlung während der Proliferation, Die oberen Blots zeigen die Kollagenbildung bei mit bFGF proliferierten Zellen, die unteren die bei mit bFGF und PDGF-BB proliferierten Chondrozyten. Die Zellen wurden jeweils 3 Wochen im Alginat mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen kultiviert. 1 = Kontrolle, ohne Faktoren; 2 = IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (10 ng/ml); 3 = IGF, TGF und PDGF-BB (2 ng/ml); 4 = IGF, TGF und IL-4 (2 ng/ml); 5 = IGF, TGF, PDGF und IL-4. Links ist jeweils der Kollagen I-Blot, rechts der Kollagen II-Blot dargestellt.

Die Proliferation mit PDGF-BB hat zur Folge, dass sich während der Redifferenzierung eine Reduzierung des Kollagen I-Gehaltes beobachten lässt. Damit einhergehend wird die Kollagen II-Synthese ebenfalls reduziert. In Bezug auf die GAG-Synthese ist jedoch eine Stimulierung zu beobachten.

3.8.1.2. Einfluss von PDGF im Wachstumsmedium auf GAG- und Kollagensynthese während der Chondroneogenese-Phase

Die wie oben beschrieben unter dem Einfluss von PDGF erhaltenen Pseudochondrone wurden zur Herstellung von high-density Pellets für 3 Wochen bei 21 % O_2 und bewährter Faktorensupplementierung kultiviert. Die nachfolgende Analyse der GAG-Gehalte der Pellets lieferte ein völlig anderes Bild als die Pseudochondrone: Die Proliferation mit PDGF wirkte sich in diesem Fall nachteilig auf die Chondrogenesefähigkeit der Zellen aus. Außer bei der Kontrolle, bei der die PDGF-Zellen höhere GAG-Werte erreichten, lagen die Mittelwerte der mit FGF proliferierten Zellen deutlich über (IT, IT IL4, PIT) oder auf dem gleichen Niveau (PIT IL4) der PDGF-vorbehandelten Zellen. Auch hier wurden die Unterschiede im G/D-Verhältnis deutlicher: Die Vorbehandlung mit FGF führte bei allen Ansätzen zu einem höheren Mittelwert (Abbildung 57), der bei IT IL4 signifikant war (t-test: t=2,595, D.F.=6, p<0,05).

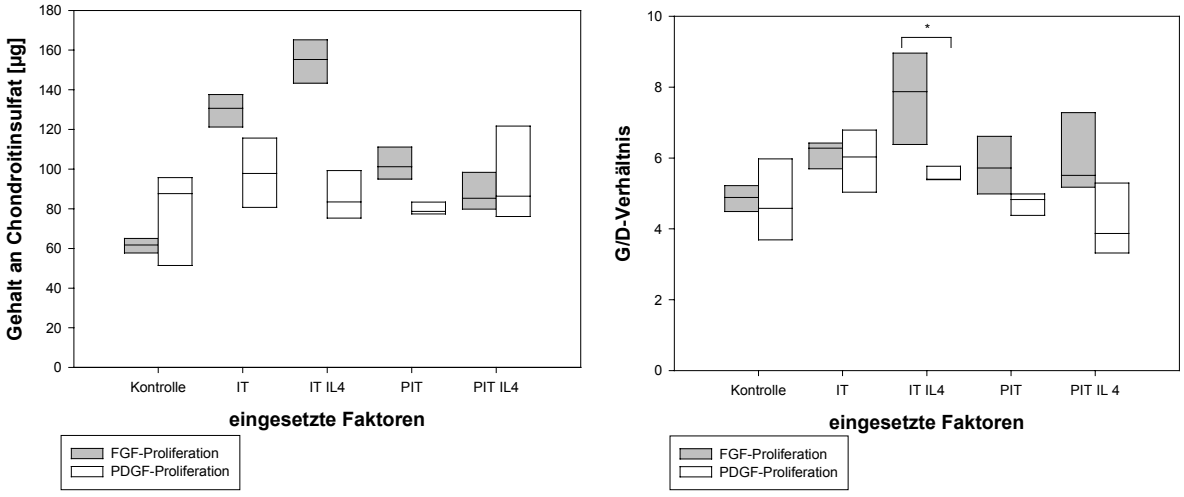


Abbildung 57: Einfluss der Proliferationsbedingungen auf die Chondrogeneserate nach der Redifferenzierung. Die Zellen wurden entweder mit bFGF proliferiert (FGF-Proliferation), oder mit einer Kombination aus bFGF und PDGF-BB (PDGF-Proliferation) und mit verschiedenen Faktorenkombinationen redifferenziert. In der linken Grafik sind die GAG-Werte, in der rechten die G/D-Relationen aufgetragen. Kontrolle: ohne Faktoren, IT: mit IGF-I und TGF-β_1, IT IL4: mit IGF, TGF und IL-4, PIT: mit IGF, TGF und PDGF-BB, PIT IL4: mit IGF, TGF, PDGF und IL-4). Die Klammer zeigt einen signifikanten Unterschied an (*=p<0,05).

Der Vergleich der Redifferenzierung mit der Chondrogenese zeigte zwei Tendenzen. Bei Zugabe von FGF war eine Zunahme des G/D-Verhältnisses zu beobachten, bei PDGF-Zugabe eine Abnahme. Diese Tendenzen waren unabhängig von den während dieser Phasen zugegebenen Wachstumsfaktorenkombinationen (Abbildung 58).

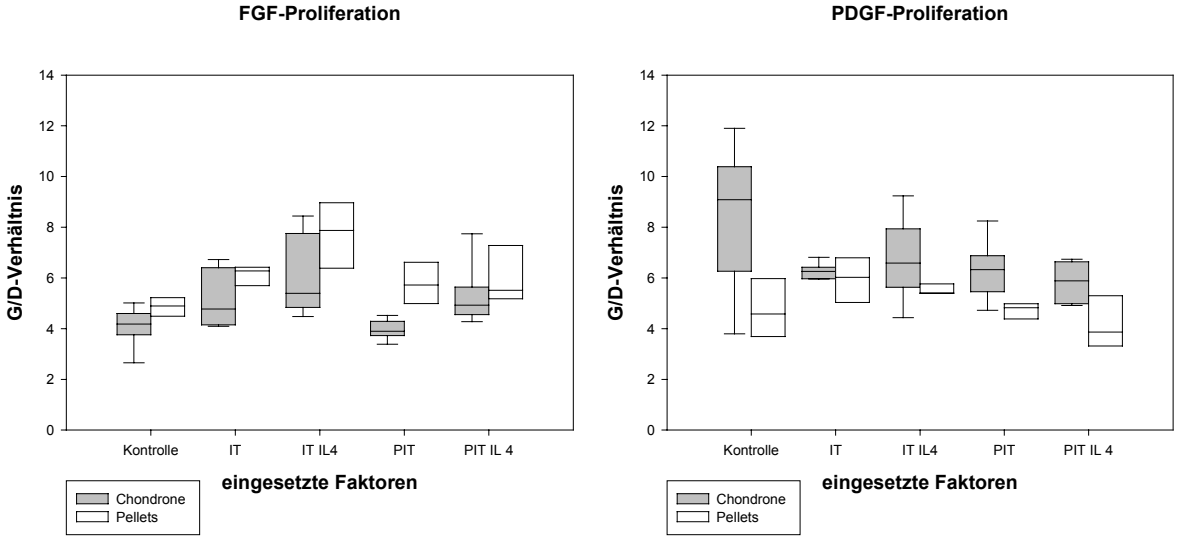


Abbildung 58: Unterschiede in den G/D-Verhältnissen, abhängig von den bei der Proliferation zugegebenen Faktoren. In der linken Grafik sind die Ergebnisse mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen dargestellt, die die mit bFGF (10 ng/ml) proliferierten Zellen erreichten, in der rechten Grafik die der mit bFGF und PDGF-BB (2 ng/ml). Kontrolle: ohne Faktoren; IT: Zugabe von IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (10 ng/ml); ITIL 4: Zugabe von IGF-I, TGF- β_1 und Interleukin 4 (2 ng/ml); PIT: Zugabe von PDGF-BB (2 ng/ml), IGF-I und TGF- β_1; PITIL 4: Zugabe von PDGF-BB, IGF-I, TGF- β_1 und Interleukin 4.

Der bei der FGF-Proliferation nachgewiesene positive Einfluss von Interleukin-4 auf die Matrixsynthese (vgl. Abbildung 57: IT gegen ITIL 4) wurde durch die Zugabe von PDGF-BB inhibiert (vgl. Abbildung 57: ITIL 4 gegen PITIL 4). Bei einer Proliferation mit PDGF konnte durch die Zugabe von IL-4 keine Steigerung der Matrixsynthese erreicht werden.

Die nach der Redifferenzierung aufgetretenen Unterschiede in der Kollagen-Produktion konnten bei den Pellets nicht mehr festgestellt werden. In allen Ansätzen wurde Kollagen II nachgewiesen, der Kollagen I-Anteil war bei allen Ansätzen sehr hoch. Bei den mit PDGF supplementierten Ansätzen wurden die höchsten Kollagen-II-Gehalte gemessen, bei der PDGF-Vorbehandlung waren die Kollagenbanden (sowohl Typ I als auch Typ II) deutlicher ausgeprägt als bei der FGF-Vorbehandlung (Abbildung 59).

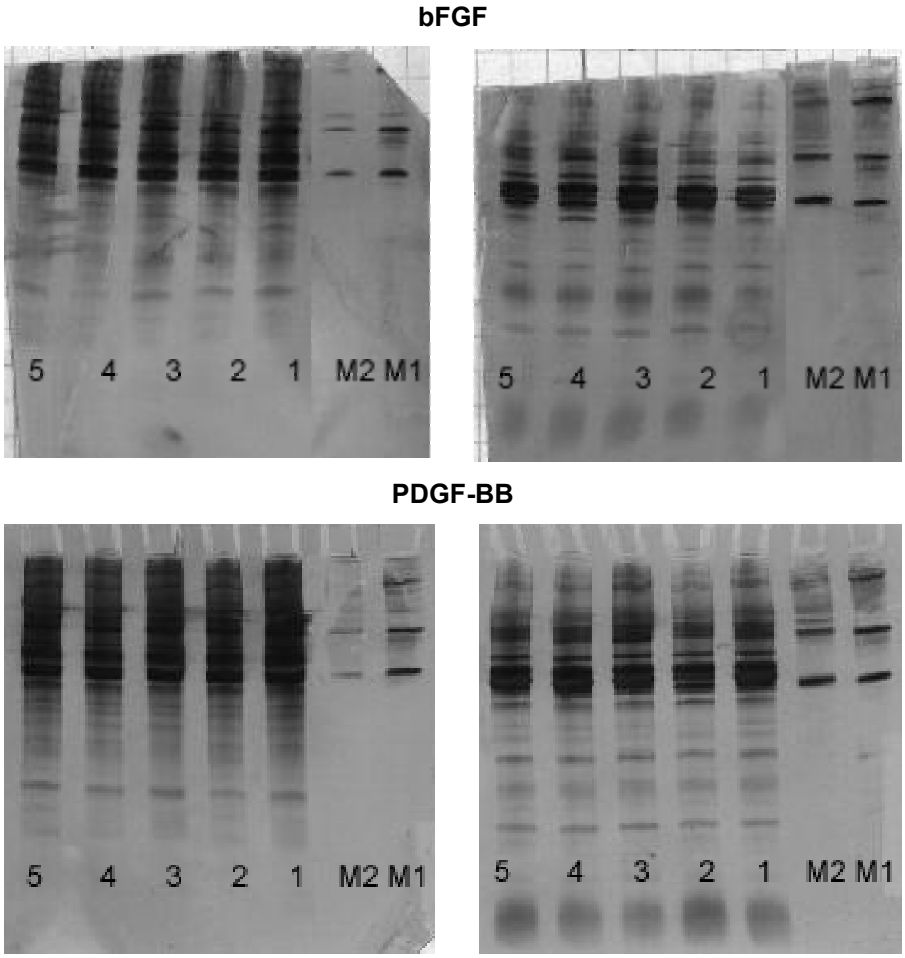


Abbildung 59: Einfluss der Vorbehandlung auf die Kollagenbildung in den Pellets. Die oberen Blots zeigen die Kollagenbildung bei mit bFGF proliferierten Zellen, die unteren die bei mit bFGF und PDGF-BB proliferierten Chondrozyten. Die Zellen wurden jeweils 3 Wochen im Alginat mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen und danach weitere drei Wochen mit gleich bleibender Faktorensupplementierung als Pellets kultiviert. 1 = Kontrolle, ohne Faktoren; 2 = IGF-I (100 ng/ml) und TGF-β_1 (10 ng/ml); 3 = IGF, TGF und PDGF-BB (2 ng/ml); 4 = IGF, TGF und IL-4 (2 ng/ml); 5 = IGF, TGF, PDGF und IL-4. Links ist jeweils der Kollagen I-Blot, rechts der Kollagen II-Blot dargestellt.

Die Kollagen II-Bildung war bei den mit FGF und PDGF proliferierten Ansätzen höher, bei Kollagen I konnten aufgrund der gebildeten Menge keine Unterschiede festgestellt werden.
Die histologische Analyse der resultierenden Pellets, am Beispiel der Kontrolle, zeigte deutliche Unterschiede je nach Vorbehandlung. In den Schnitten von Knorpelpellets, die mit FGF proliferierten wurden, war kaum Kollagen II nachweisbar. Die Matrix war gleichmäßig vorhanden, aber in geringerem Maße als bei den mit PDGF proliferierten Zellen. Diese bildeten ausgeprägte Matrixinseln, in denen viel Kollagen beider Typen gebildet wurde (Abbildung 60).

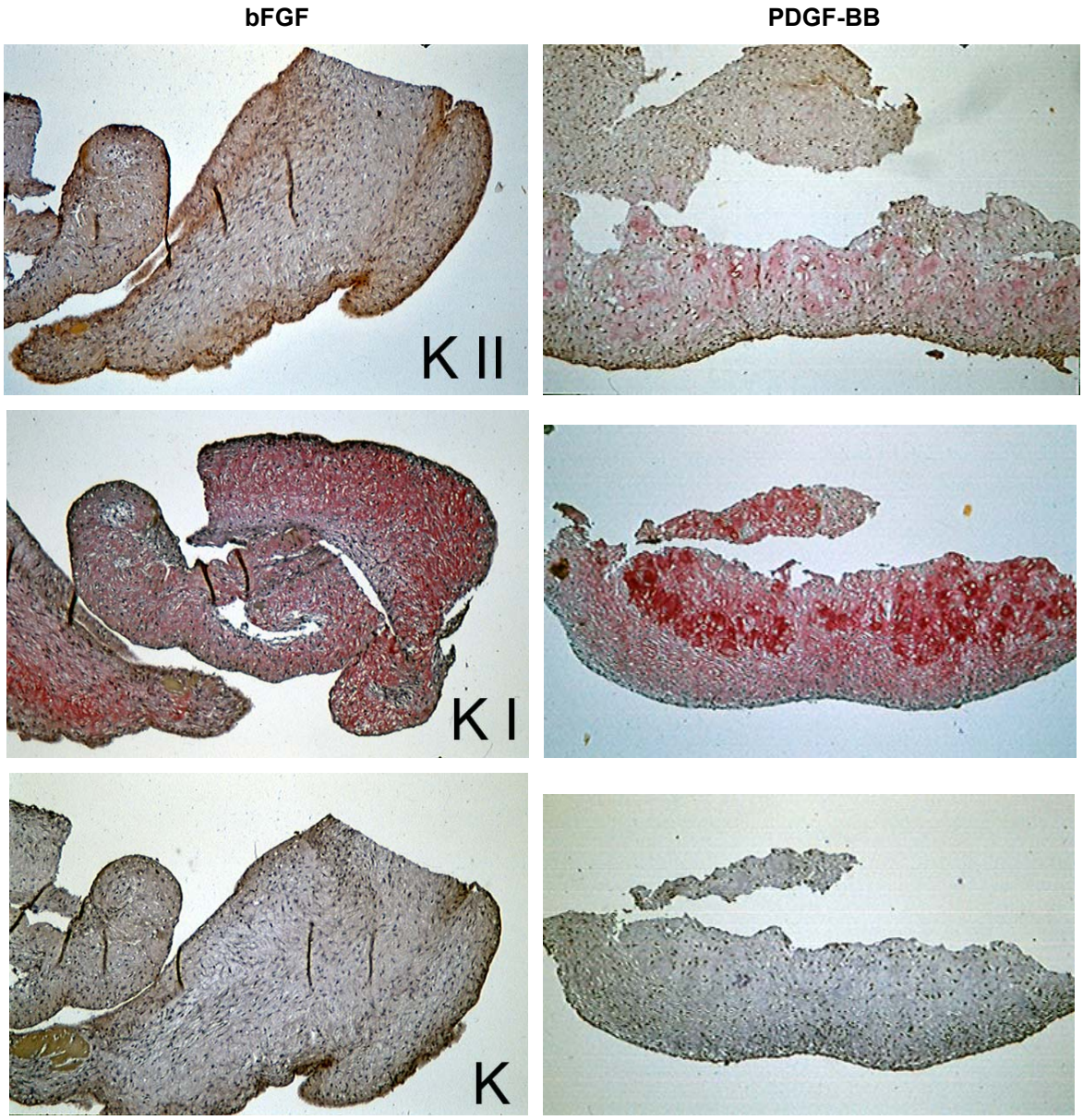


Abbildung 60: Auswirkung der Proliferationsbedingungen auf die gebildeten Pellets. Links sind die Bilder der mit bFGF proliferierten, rechts die der mit bFGF und PDGF-BB proliferierten Chondrozyten gezeigt. Die Zellen wurden ohne Faktoren kultiviert. Von oben nach unten: Kollagen II, Kollagen I, Negativkontrolle. Immunhistochemie, Vergrößerung 100fach.

Ein weiterer Unterschied ließ sich bei den Pellets nachweisen, die mit IGF, TGF und IL-4 differenziert wurden. Bei der Vorbehandlung mit FGF führte diese Kombination zu einer sehr ausgeprägten Matrixbildung, die sich bis nahe an den Rand des Pellets erstreckte. Bei den mit PDGF proliferierten Chondrozyten liess sich ebenfalls Matrixbildung nachweisen, diese war jedoch auf das Innere des Pellets beschränkt, die Randzone mit wenig Matrix war hier wesentlich deutlicher ausgeprägt (Abbildung 61).

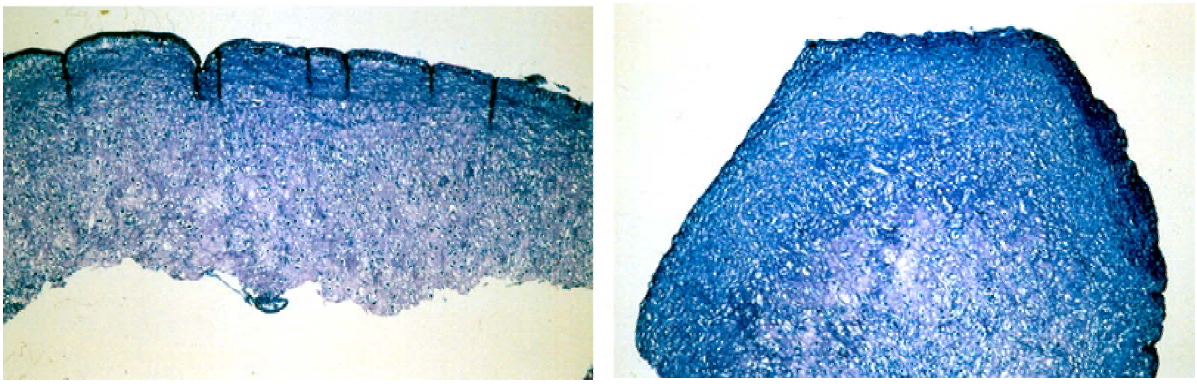


Abbildung 61: Vergleich der Matrixbildung, abhängig von den bei der Proliferation eingesetzten Faktoren. Im linken Bild ist das Pellet gezeigt, das aus mit bFGF proliferierten Chondrozyten hergestellt wurde, im rechten das aus mit PDGF proliferierten Zellen. Die gebildete Matrix erstreckt sich links bis nahe an den Rand, während sie rechts auf das Innere des Pellets beschränkt ist. Beide Pellets wurden mit IGF, TGF und IL-4 redifferenziert und als Pellets kultiviert. Färbung mit Toluidinblau, 100fache Vergrößerung.

Der Vergleich der unterschiedlichen Auswirkungen von nur zweier verschiedenen Wachstumsfaktoren belegt eindrucksvoll die weitreichende Bedeutung permissiver Einflüsse auf zelluläre Leistungen wie Differenzierung und Matrixsynthese. Am Beispiel der Stimulation der Proliferation von humanen Chondrozyten mit bFGF allein und in Kombination mit PDGF zeigte sich, in welchem Ausmaß die Sensitivität der Zellen gegenüber später applizierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen damit geprägt wird. Im konkreten Fall führte die Einflussnahme von PDGF dazu, dass die Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Kollagen Typ-II-Synthese erwarben. Diese neue Eigenschaft geht zwar offensichtlich zu Lasten der Matrixsynthese, doch eröffnet sich damit die prinzipielle Möglichkeit, das gewünschte optimal erscheinende Verhältnis von Matrix- und Kollagensynthese auf der Ebene der mitogenen Wachstumsfaktoren einzustellen. Allerdings erweitert sich der experimentelle Aufwand damit nicht unerheblich.

3.9. Gewichtsverteilung der gebildeten Knorpelpellets

3.9.1. Korrelation Gewicht zu GAG

Der Einfluss der Redifferenzierung und die Analyse der gebildeten Pellets wurde vor allem anhand der Marker Kollagen und GAG bestimmt. In einigen Fällen konnte eine Entkopplung der GAG- und Kollagen-Synthese beobachtet werden. Eine nicht destruktive Qualitätsbestimmung des gebildeten Knorpels ist für Ziele des Tissue engineerings relevant. Daher sollte auch das Gewicht daraufhin untersucht werden, wie weit sich qualitative Aussagen ableiten lassen.

Dazu wurden von den hergestellten Pellets, die ein Gewicht über ein Milligramm aufwiesen, die Gewichtswerte aufgezeichnet und in bezug auf die absolute GAG-Produktion analysiert. Die lineare Regression über alle Werte zeigte bereits eine signifikante Korrelation zwischen dem Gewicht der Pellets und den gemessenen GAG-Werten (Korrelationskoeffizient R=0,642; R^2=0,389, p<0,001; n=164). Die nichtlineare Regression beschrieb die Werte deutlich besser (Korrelationskoeffizient R=0,731; R^2=0,531, p<0,001; n=164). In Abbildung 62 sind diese Regressionsanalysen dargestellt. Verantwortlich für das Abweichen von der Linearität sind vor allem Pellets mit einem hohen GAG-Gehalt über 200 mg und verhältnismäßig geringem Gewicht. Sie entstanden sämtlich bei hohen TGF-Konzentrationen.

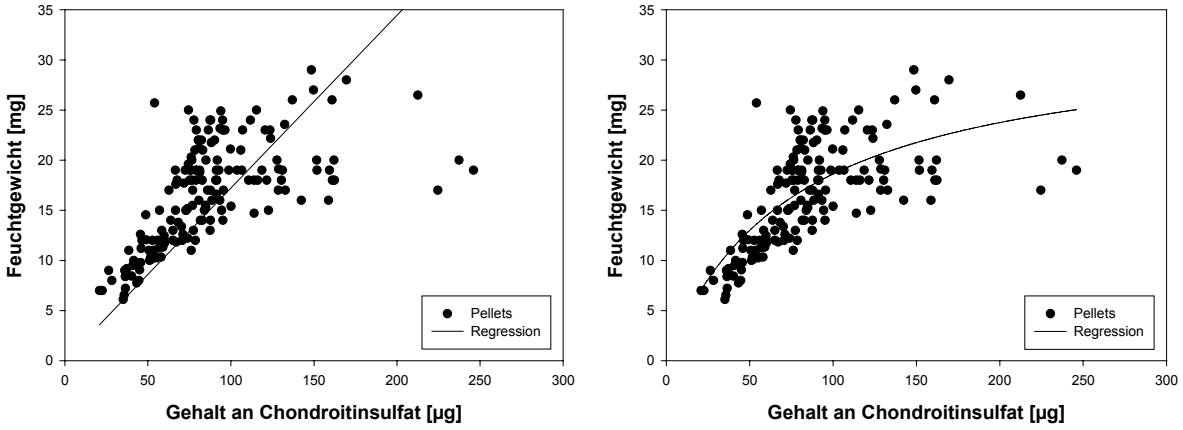


Abbildung 62: Vergleich der linearen und nicht linearen Korrelation zwischen dem Gewicht der Pellets und dem GAG-Gehalt. Jeder Punkt bezeichnet ein Pellet, die durchgezogene Linien sind die jeweiligen Regressionsgeraden über alle Werte. Regressionsgleichungen: Linear: Gewicht = 9,579 + (0,0811 * GAG); nicht linear: Gewicht=32,78 * GAG / (76,09 + GAG).

Im unteren Gewichtsbereich der Knorpelpellets bis etwa 15 mg liegen die Werte nahe beisammen und zeigen einen linearen Zusammenhang. Darüber sind deutliche Abweichungen zu erkennen. Diese sind auf zwei unterschiedliche Effekte zurückzuführen. Besteht die gebildete Matrix hauptsächlich aus sulfatierten Glykosaminoglykanen, so ist der Wassergehalt hoch, was zu einem höheren Gewicht führt (vgl. Kap. 1.1.1). Ohne Bildung von Kollagen Typ II ist ein linearer Zusammenhang zwischen Feuchtgewicht und GAG-Gehalt zu erwarten. Die Ausbildung eines Kollagennetzwerks begrenzt die Wasseraufnahmekapazität. Eine Verringerung des Gewichtes bei gleichem GAG-Gehalt liefert daher indirekt Hinweise auf das Kollagen – GAG-Verhältnis in der gebildeten Matrix. Diese wurde besonders bei der hohen TGF-Konzentration während der Redifferenzierung beobachtet.

3.9.2. Einfluss von Interleukin-4 auf das Gewicht der Pellets

Die Stimulierung der Matrixsynthese durch Interleukin-4 wurde in Kapitel 3.7 bereits gezeigt. Besonders der Gehalt an Chondroitinsulfat wird positiv beeinflusst. Eine Analyse der Pellets sollte daher hauptsächlich den Anteil von GAG am Gewicht zeigen. Eine hemmende Wirkung von PDGF auf die von IL-4 bewirkte Matrixstimulierung wurde nachgewiesen (Kap. 3.8.1.2), daher wurden die Pellets, die mit PDGF behandelt wurden, nicht mit in die Auswertung einbezogen. Besonders deutlich wird hier, dass der Hauptanteil (40 von 48; 83%) der mit Interleukin-4 behandelten Pellets ein Gewicht über 15 mg aufwies (Abbildung 63). Die mit Interleukin-4 behandelten Zellen bildeten generell mehr Matrix und lagen in einem höheren Gewichtsbereich als die Pellets, die nicht mit diesem Faktor kultiviert wurden.

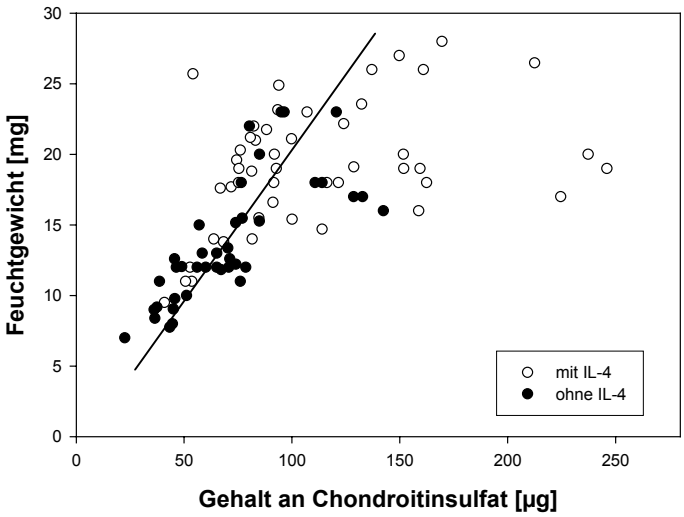


Abbildung 63: Gewichtsverteilung der Knorpelpellets mit oder ohne Interleukin-4-Exposition. Die schwarzen Punkte sind Werte von Pellets, die während der Kultivierung nicht mit Interleukin-4 in Kontakt gekommen sind, die weißen Punkte sind Pellets, die mit Interleukin-4 behandelt wurden. Die Pellets, die mit PDGF-BB kultiviert wurden, sind nicht enthalten. Die Gerade kennzeichnet den Bereich, in dem eine lineare Beziehung zwischen der Zunahme an Gewicht und GAG-Gehalt besteht.

Die Zugabe von Interleukin-4 führt zu einer Stimulierung der Matrixsynthese und einer Zunahme der Pelletgewichte. Die Korrelation zwischen GAG-Synthese und Feuchtgewicht konnte bestätigt werden. Die Wirkung der Begrenzung der Wasseraufnahme durch die Bildung von Kollagen Typ II bewirkt ein Abweichen von der Linearität. Die Werte, die rechts der Geraden liegen, zeichneten sich durch erhöhte Kollagensynthese aus.

4. Diskussion

4.1. Relevanz des DNA-Gehaltes und Einführung des G/D-Verhältnisses

Eine Messgröße, die bei allen Versuchen aufgenommen wurde, war der DNA-Gehalt der analysierten Proben. Dieser lässt anhand der erstellten Eichgeraden direkte Rückschlüsse auf die Zellzahl zu. Der absolute DNA-Gehalt wurde jedoch nur bei den Proliferationsexperimenten und beim Test der Chondrogenesefähigkeit als reiner Messwert in die Auswertung der Ergebnisse mit einbezogen. Für die Beurteilung der Syntheseleistung der Zellen wurde stattdessen der G/D-Quotient aus Proteoglykangehalt (GAG) und DNA-Gehalt eingeführt. Dies ist nicht nur vorteilhaft, als sich durch die Bildung einer Relation sowohl statistische Vergleiche, als auch Vergleiche zwischen Versuchen mit deutlich unterschiedlichen Ausgangssituationen (z.B. unterschiedliche Passagen, Donoren etc.) ziehen lassen, sondern erlaubt auch Rückschlüsse auf die proliferative Leistung der Zellen während der Redifferenzierungsphase und der Chondrogenese. Daher wurde im Allgemeinen darauf verzichtet, die DNA-Werte immer mit anzugeben.

4.2. Proliferation der Chondrozyten

4.2.1. Proliferation

Nicht nur für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit, sondern auch für das Ziel des Tissue Engineering ist eine für die Gewebeneubildung ausreichende Zellzahl Voraussetzung. Werden die Zellen etwa aus einer Biopsie gewonnen, so erhält man nach dem Verdau des Knorpels nur 10^5 – 10^6 Zellen. Diese Anzahl ist für eine therapeutisch verwendbare Züchtung neuen Gewebes viel zu gering. Daher ist es unumgänglich, die Zellen signifikant *in vitro* zu vermehren.

Das in dieser Arbeit angewendete Protokoll ist ein Ergebnis langwieriger Versuche (persönliche Mitteilung Goepfert), die vor allem gezeigt haben, dass die Proliferationsrate zwar von der Zugabe des richtigen Mediums, viel mehr aber noch von der Wahl des geeigneten Serums abhängt. Nur etwa ein bis zwei von 20 getesteten Seren erweisen sich als geeignet, die Proliferation zu unterstützen. Das experimentell benutzte Serum wurde durch solch einen aufwändigen Serumtest ermittelt. Der Einsatz einer Reihe sogenannter serumfreier Medien konnte noch nicht überzeugen. Mit dem Zusatz ausgewählter Seren gelang es, die humanen Chondrozyten im genutzten Passagenbereich zu hohen Zellzahlen zu proliferieren. Dabei erwies sich die Zugabe von bFGF und EGF als essentiell.

Die mitogene Wirkung von bFGF auf artikuläre Chondrozyten ist sehr gut untersucht und wird häufig angewendet (Jones und Addison, 1975; Prins et al., 1982; Sachs et al., 1982; Osborn et al., 1989; Trippel, 1995). Auch auf sclerale Chondrozyten und Fibroblasten hatte bFGF den höchsten proliferativen Effekt. Hier war eine Dosisabhängigkeit zu beobachten: zwischen 1 ng/ml und 100 ng/ml stieg die Proliferation exponentiell an (Seko et al., 1995). Für alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 10 ng/ml gewählt, da die Wirkung des bFGF sich bei dieser Konzentration bereits in der exponentiellen Phase befindet. Eine Supplementierung mit 100 ng/ml wäre nur geeignet, etwa 20% zusätzliches Proliferationspotential auszunutzen.

Entsprechend der Literaturangaben zur Morphologie (z.B. Kolettas et al., 1995; Ap Gwynn et al., 2000) nahmen die Zellen während der Proliferation in Zellkulturflaschen eine spindelförmige Gestalt an. In den ersten Passagen zeigten sie nur geringe Proliferationsraten. Nach Einfrieren und Auftauen der Zellen ist damit zu rechnen, dass die Zellen weniger empfänglich für Wachstumsfaktoren sind als frisch isolierte (Harrison jr. et al., 1991). Bereits die Kultivierung in Zellkulturflaschen wirkt mitogen, diese Wirkung des Polystyrol konnte in Kapitel 3.2 bestätigt werden.

4.2.2. Dedifferenzierung der Chondrozyten während der Proliferation und Bildung von „Subpopulationen“

Als Folge der Proliferation in Monolayerkultur wurde neben dem Auftreten einer spindelförmigen Gestalt der Zellen während der Adhäsion an Oberflächen der Kulturgefäße (Polystyrol) auch eine verminderte Ausprägung knorpelspezifischer Marker, vor allem Kollagen Typ II beobachtet. Die Chondrozyten wurden in geringer Dichte (10^4 Zellen/cm^2) ausgesät, um eine maximale Expansion der Zellen pro Passage zu erreichen. Bei noch geringerer Dichte fand keine Netto-Proliferation der Zellen mehr statt (pers. Beob.). Mit fallender Anfangszelldichte scheint das Ausmaß der Dedifferenzierung der Zellen gefördert zu werden. Das entspricht auch Beobachtungen von Watt (1988). Marker wie Kollagen II und GAG waren bei dieser Zelldichte in weit höherem Maße ausgeprägt, als in sogenannten low-density-Monolayern.

Die Verwendung des Begriffes „Dedifferenzierung“ der Chondrozyten ist sehr uneinheitlich. In den meisten Arbeiten wird bereits nach zwei bis drei Passagen von stark dedifferenzierten Chondrozyten gesprochen, obwohl diese meist nur eine verminderte Genexpression von Kollagen Typ II zeigten. Im Vergleich dazu sind die hier dargestellten Ergebnisse mit Zellen gewonnen worden, in denen auch mit der Immunblot-Methode keine Bildung von Kollagen Typ II mehr nachweisbar war. Dies gilt auch für die Synthese von Kollagen Typ I.

Die Entscheidung, diese Arbeit mit intensiv passagierten und damit auch stärker dedifferenzierten Zellen durchzuführen, gründet sich auf die Zielvorgabe, dass die Ergebnisse für die *in vitro* Herstellung von Knorpelimplantaten zur Therapie von Gelenkflächen genutzt werden sollen.

Als Folge der Dedifferenzierung der humanen Chondrozyten ergab sich die in Kapitel 3.2 gezeigte Abnahme der Kollagensynthese. Dabei wurde von folgender Vorstellung ausgegangen: Die Reduzierung der Kollagensynthese ist weniger auf die verminderte Genexpression der Kollagene der einzelnen Zellen zurückzuführen, als auf eine Abnahme des Anteils der differenzierten Zellen, was sich nur statistisch als unterschiedlicher Dedifferenzierungsgrad der Zellen der Gesamtpopulation äußert. Wenn einige Chondrozyten bereits in den ersten Passagen ihre Fähigkeit zur Kollagenexpression einbüßen, andere dagegen auch in späteren Passagen noch in der Lage sind, Kollagene zu bilden, führt das mit zunehmender Passagenanzahl zu einer gemischte Population unterschiedlich stark differenzierter Chondrozyten. Diese Hypothese war Grundlage für die Planung der Experimente zur präparativen Nutzung der Zellen.

4.3. Möglichkeiten und Grenzen des 2-Phasen-Systems (high-density-Kultur) bei humanen Chondrozyten

Die high-density-Kultur wird vielfach als analytisches *in vitro*-Modell für die Messung der Fähigkeit der Zellen zur Knorpelbildung genutzt. Zur Studie der Matrixbildung und des Turnovers von Matrixmolekülen, vor allem von Proteoglykanen, wurde häufig mit „high-density Monolayern“ in Zellkulturflaschen gearbeitet (Solursh und Linsenmayer, 1982; Cadenas, 1989; Clar et al., 1991; Jay et al., 2000). Die Chondrozyten sezernieren Faktoren in das Medium und regulieren damit ihren Metabolismus. Anhand der Überstände können die gebildeten Matrixfaktoren analysiert werden. Die Kulturen blieben jedoch nicht lange stabil. Auch eine Weiterverarbeitung der Zellen war nicht möglich, da sich keine zellassoziierte Matrix bildete (Häuselmann et al., 1996).

Im Gegensatz zum klinisch etablierten ein-Phasen-System (ACT bzw. MACT) bietet diese Methode jedoch deutliche Vorteile. Einerseits kann durch eine gezielte Stimulierung der Chondrozyten eine hohe Proliferationsrate erreicht werden, so dass für Ziele des Tissue Engineering ausreichend hohe Zellzahlen erreicht werden. Andererseits wird es durch die Einführung einer Phase zur *in vitro* Chondroneogenese möglich, diese gezielt durch Variation der Kulturbedingungen und Zugabe von Wachstumsfaktoren zu beeinflussen. Eine Möglichkeit bestand beispielsweise auch darin, einen Sauerstoffpartialdruck von 21 % in der Zellkultur zu nutzen. Obwohl diese Bedingung in natürlichem Knorpel nicht vorkommt

(Brighton und Happenstall, 1971), führt sie zu einer deutlichen Steigerung der Matrixsyntheserate (Kap. 3.7.1). Des weiteren führt der Wechsel der Kulturbedingungen zu einer Hemmung der Zellproliferation.

Eine Anwendung dieser Methode führt bei Osteoblasten zu implantierbarem Knochen (Abukawa et al., 2003) und auch bei anderen Zelltypen können gute Ergebnisse beobachtet werden (zusammengefasst von Ochoa & Vacanti, 2002). Bei humanen Chondrozyten sind die Möglichkeiten dieser Methode jedoch durch die Dedifferenzierung der Zellen bei intensiver Passagierung begrenzt: Die erzielten Ergebnisse bestätigen recht deutlich die passagenabhängige Abnahme des Chondrogenesepotentials der humanen Chondrozyten (Kap. 3.3). Diese erwies sich darüber hinaus als altersabhängig: in „jungen" Zellen konnte bis zu vier Passagen lang ein knorpelähnlicher Phänotyp durch *in vitro*-Kultivierung erreicht werden, bei „älteren" Zellen wurde bereits in der dritten Passage kaum noch detektierbares Kollagen II gebildet. Die GAG-Werte unterschieden sich ebenfalls. Bei jungen Zellen derselben Passage wurde bis zu viermal mehr GAG gebildet als bei den älteren Zellen. Die Möglichkeit, dieses System für Ziele des Tissue Engineering einzusetzen, ist daher auf primäre und Zellen der ersten Passagen beschränkt. Dort liefern sie deutlich bessere Ergebnisse als das ein-Phasen-System. Bei der notwendigen Proliferierung der Chondrozyten zu hohen Zellzahlen über die ersten Passagen hinaus ist eine präparative Nutzung dieser Methode allein nicht für eine Herstellung von Knorpelimplantaten geeignet. Die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren führt zwar zu einer Steigerung der Matrixsynthese (vgl. Kap. 3.7.1), die Bildung von Kollagen Typ I überwiegt jedoch (Kap. 3.4).

Hier zeigt sich erneut deutlich, wie stark sich die Proliferation auf die Dedifferenzierung der Zellen und die Bildung von Subpopulationen auswirkt. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren führt nur bei suszeptiblen Zellen zu einer Reaktion (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 52), deren Anteil an der Gesamtpopulation mit zunehmender Passagierung exponentiell abnimmt.

Dieser Effekt führte zu der Idee, den Zellen zunächst eine Gelegenheit zur Redifferenzierung zu bieten, während der die Synchronisation der Populationen auf einen einheitlichen Differenzierungsstatus erreicht werden sollte. Erst danach sollte durch die Applikation der *high-density*-Kultur die Chondroneogenese angeregt werden.

4.4. Vorteile und Einflussgrößen der zusätzlichen Redifferenzierungsphase

4.4.1. Auswahl des Kultursystems

Prinzipiell sind Agarose und Alginat für eine Redifferenzierung der Zellen geeignet. Für präparative Methoden hat sich jedoch nur Alginat bewährt, weil eine die Zellen schonende Herauslösung aus dem Gel möglich ist. Für die Redifferenzierung der Chondrozyten bringt dieses Kultursystem sehr gute Voraussetzungen mit: Mitogene und Zell-Zell-Kontakte werden ausgeschlossen. Das bedeutet einerseits eine Beendigung der Proliferation, andererseits einen Aufschub der Chondroneogenese.

4.4.2. Marker für die Redifferenzierung

Mit der Abnahme der Fähigkeit zur Synthese von Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen sind die Marker für die Dedifferenzierung humaner Chondrozyten relativ klar definiert. Für den umgekehrten Prozess, die Redifferenzierung, scheint die Definition mit der Zunahme der Fähigkeit zur Synthese dieser Matrixmoleküle zunächst trivial. Praktisch erwies es sich jedoch als nicht durchführbar, eine eindeutige Korrelation zwischen der Synthese der Marker und dem Grad der Redifferenzierung der Zellen zu bestimmen. Der Haupteffekt einer Redifferenzierung der Zellen besteht in der Synchronisation der Zellpopulation als Voraussetzung für eine erhöhte Syntheserate während der Chondroneogenese. Die Synthese von Matrixmolekülen beginnt zwar bereits in der Redifferenzierungsphase, ist aber nur von untergeordneter Bedeutung. Da die Redifferenzierung außerdem ein artifizielles System ist, das nur *in vitro* zum Tragen kommt, bestehen bei der Definition ihrer Marker weiterhin Schwierigkeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden die GAG-Synthese und die Ausprägung von Kollagen Typ I und II unmittelbar nach der Redifferenzierung als Marker herangezogen. Die geringe Aussagekraft der Marker zur Bestimmung des Grades der Redifferenzierung wurde dadurch kompensiert, dass im Kontext des 3-Phasen-Modells auch die gebildeten Knorpelgewebspellets analysiert wurden. Bei diesen ließen sich deutliche Einflüsse einer erfolgreichen Redifferenzierung in Form stark erhöhter Syntheseleistungen anhand dieser Marker nachweisen. Das Problem, den Grad der Redifferenzierung in Bezug die Gesamtzellpopulation zu definieren, bleibt bestehen.

Die Entscheidung, welche Marker den Grad der Redifferenzierung am besten beschreiben, soll hier nicht getroffen werden. Es scheint jedoch, dass die Kollagene als Marker geeignet sind, einen Teilaspekt der Redifferenzierung zu belegen. Wirkungen, die erst während der Chondroneogenese auftreten, können jedoch trotz experimentell nachgewiesener Redifferenzierung dazu führen, dass die Neubildung von Knorpel reduziert oder unterbunden

wird. Zusammenfassend beschreibt die Bildung von Kollagen Typ II einen Teilaspekt der Redifferenzierung humaner Chondrozyten als „status quo“ unmittelbar nach der Redifferenzierung. Auswirkungen auf die Chondrogoneogenese können anhand der Analysen von Pseudochondronen jedoch nicht sicher vorhergesagt werden. Dazu müsste ein online-Monitoring der in Kultur gehaltenen Chondrozyten etabliert werden. Die Wahl eines geeigneten Markers ist jedoch noch nicht getroffen. In der Literatur werden verschiedene Marker vorgeschlagen, die die Genexpression von Knorpelmolekülen beschreiben. Unter anderem wird mRNA von Kollagen Typ II und Aggrecan (Chen et al., 2003), oder zusätzlich Kollagen Typ X und Sox9 (Girott et al., 2003) als Differenzierungsmarker angesehen. In jüngster Zeit wurden von Krakow et al. (2003) mit Hilfe von cDNA-Microarrays Vergleiche zwischen dedifferenzierten Chondrozyten (Passage 4) und fötalem Knorpel gezogen, die sich auf eine cDNA-Datenbank mit 377 Klonen stützte. Im Knorpel sind vor allem die Kollagene (2A1, 9A1-3, 10A1 und 11A1-2) mindestens dreifach stärker ausgeprägt als bei dedifferenzierten Zellen. Auch einige bisher für den Knorpel unbekannte Gene wurden gefunden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Monitoring von CD-RAP (*cartilage derived retinoic acid-sensitive protein*; Bosserhoff & Buettner, 2003), andere müssen noch evaluiert werden.

4.4.3. Induktion der Redifferenzierung durch die Einbettung in Alginat – Vergleich zwei- und drei-Phasen-System

Es bestand die Frage, ob die Einbettung der Zellen in Alginat, d. h. die Verhinderung mitogener Kontakte bereits ausreicht, die Redifferenzierung einzuleiten.

In Kapitel 3.6.1 konnte gezeigt werden, dass die high-density-Kultur zu wesentlich geringeren Werten führte als das 3-Phasen-System, die Zellen bildeten nur unwesentliche Merkmale differenzierten Knorpels aus. Die GAG-Werte lagen um einen Faktor 3,9 bis 15 niedriger als bei Zellen, die vorher im Alginat redifferenziert wurden. Der Vergleich zwischen diesen Zellen ist insofern möglich, als sich die Dauer der Kultivierung in Chondrogenesemedium zwischen den Ansätzen nicht unterscheidet. Eine zusätzliche Chondrogenesezeit, die der Kultivierung in Alginat entsprechen würde, wurde nicht vorgenommen, da sich die Werte der Pellets aus HD-Kulturen in dieser Zeit im Allgemeinen nicht verbesserten, sondern eher verschlechterten (pers. Beob.).

Die gezeigten Versuche wurden unter konstanten Bedingungen während der Redifferenzierung und der Chondroneogenese durchgeführt. Die Einführung der Redifferenzierungsphase zeigte unter diesen Kulturbedingungen positive Effekte, eine Induktion der Redifferenzierung durch diese Phase kann bestätigt werden.

4.4.4. Sauerstoff als Differenzierungssignal

Nach dem Erreichen des Ziels einer Induktion der Redifferenzierung in Bezug auf die Matrixsynthese wurde als nächstes Ziel eine Stimulierung der Kollagen Typ II-Synthese durch Synchronisation der Zellpopulation auf einen einheitlichen Differenzierungsgrad gesteckt.

In differenzierten Chondrozyten ist die Syntheserate von Kollagen Typ I und II bei 21 % Sauerstoffpartialdruck deutlich höher als bei 5 %. In der Alginatphase wurde jedoch das umgekehrte Phänomen beobachtet (Kap. 3.5.2). Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Absenkung des Sauerstoffpartialdruckes auf 5 % die Anzahl von Zellen mit der Fähigkeit zur Kollagen Typ II-Synthese angestiegen ist. Quantitativ muss dieser Effekt den der Verlangsamung der Syntheserate bei fallendem O_2-Partialdruck übertroffen haben.

Domm et al. (2000) wiesen für Rinderknorpel nach, dass eine Redifferenzierung nach zweiwöchiger Kultivierung in Medium + Vitamin C und E bei 5% Sauerstoff möglich war, während bei 20 % keine Redifferenzierung stattfand. Da in diesem Experiment keine Passagierung der Zellen vorgenommen wurde, handelt es sich eher um primäre Zellen, als um wirklich Dedifferenzierte. In einem Versuch von Hansen et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass proliferierende Chondrozyten bei auf 5 % reduziertem Sauerstoffpartialdruck und einem intermittierenden hydrostatischen Druck besser proliferieren und die Kollagen II-Synthese höher ist als bei 21 %.

Es ist bekannt, dass Chondrozyten reaktive Substanzen wie H_2O_2, Superoxid, Sauerstoffradikale und NO („ROS, *reactive oxygen species*“) erzeugen (Henrotin et al., 1993; Rathakrishnan und Tiku, 1993). Chondrozyten in Agarosekultur sind sensitiv für diese ROS. Wenn kein Antioxidans zugegeben wird, nimmt die Viabilität der Zellen in hohem Maße ab (Tschan et al., 1990). Die Zellen bilden selber Antioxidantien, z. B. Glutathion oder Cystein (Cadenas, 1989). Eine Erniedrigung des O_2-Partialdruckes reduziert auch die Menge der gebildeten ROS.

Der positive Einfluss des reduzierten Sauerstoffpartialdrucks während der Redifferenzierung lässt sich am besten dadurch erklären, dass es sich hierbei um ein Differenzierungssignal für die Chondrozyten handelt. Die deutlichen Unterschiede in der Kollagenbildung sprechen sehr stark für diese Theorie, ebenso die beobachteten Effekte auf die nachfolgende Chondrogenese. Im Gegensatz zur Redifferenzierung, für die ein niedriger O_2-Partialdruck vorteilhaft ist, konnte gezeigt werden, dass die Chondrogenese durch eine Reduktion eher inhibiert wurde. Hier wurden die besten Ergebnisse bei 21 % Sauerstoffpartialdruck erreicht. Auch diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur. O´Driscoll et al. (1997) wiesen eine maximale Chondrogeneserate bei 12-15 % Sauerstoff nach, Lee & Urban (1997) zeigten bei anoxischen Bedingungen eine Laktatproduktion als Endprodukt der Glykolyse, die nur bei 39 % der aeroben Produktion (21 % O_2) lag. Das Wachstum und die Chondroneogenese

gehen bei 21 % wesentlich schneller als bei reduzierten Bedingungen. Dies ist verhältnismäßig einfach zu erklären. Während bei der Redifferenzierung nicht so sehr die Syntheseleistung relevant ist, spielt sie bei der Proliferation und der Matrixbildung eine wesentliche Rolle. Je mehr ATP vorhanden ist, desto schneller können die relevanten Endprodukte gebildet werden. In diesen Phasen führt eine Verringerung des Partialdrucks also zu einer Verlangsamung der Synthese, ein hoher O_2-Gehalt hat zur Folge, dass die Chondrozyten sowohl schneller proliferieren, als auch die Matrixbildung wesentlich schneller stattfinden kann.

Im Vergleich dazu stellt sich die Situation im reifen nativen Knorpel ganz anders dar. *In situ* sind die Zellen nur sehr geringen Sauerstoffgehalten ausgesetzt. In tiefen Bereichen des Knorpels kann der Sauerstoffgehalt auf 1 % absinken (Brighton und Happenstall, 1971) und die Chondrozyten sind an diese Verhältnisse vor allem dadurch angepasst, dass sie ihre Energiegewinnung der Erhaltungsenergie vorwiegend über anaerobe Glykolyse steuern. Dies widerspricht aber auf den ersten Blick den gezeigten Ergebnissen. Da die Chondrozyten jedoch im adulten Knorpel keine Proliferation zeigen, keine Chondroneogenese betreiben und ihre Hauptaufgabe in der Bildung der Matrixmoleküle, und damit dem Erhalt der Matrix besteht, ist diese Art der Energiegewinnung vorteilhaft und effizient an die Umgebung angepasst. Dies bedeutet aber auch, dass die Einstellung eines physiologischen Sauerstoffgehaltes in der Zellkultur dazu führen würde, dass keine Redifferenzierung und Chondroneogenese stattfinden würde. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von O´Driscoll et. al (1997) unterstützt, die zeigten, dass bei Sauerstoffgehalten unter 5 % keine Knorpelneubildung und keine Kollagen II-Synthese mehr stattfand. Auch Lee und Urban (1997) wiesen nach, dass anoxische Bedingungen die Glucoseaufnahme und die Laktatproduktion inhibieren, sich also direkt in der ATP-Produktion der Chondrozyten niederschlagen, die über Substrat-Level Phosphorylierung in der Glykolyse stattfindet. Durch die Bereitstellung einer „Mikroumwelt“, die den Verhältnissen im wachsenden Knorpel (z. B. Epiphysenplatte) ähnelt (keine oder wenig Zell-Zell-Kontakte durch das Alginat, physiologischer Sauerstoffgehalt und Retention der gebildeten Moleküle durch das Alginat) wird die Redifferenzierung verbessert.

Eine weitere Verbesserung wurde durch die Verlängerung der Redifferenzierungsphase erreicht. Die Redifferenzierung benötigt mehr Zeit, wenn die Zellen im vorhinein durch Monolayerkultur und Passagierung stark dedifferenziert wurden. Auch die Synchronisation des Differenzierungsgrades wird durch eine längere Verweildauer begünstigt. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass die Syntheseraten von GAG und Kollagen Typ II gegenüber dem 2-Phasen-System signifikant anstiegen. Der Einfluss der Verweildauer wurde für humane Chondrozyten in Alginat (dedifferenziert, P 3) bereits von Yaeger et al. (1997) untersucht. Sie konnten nachweisen, dass sich eine längere Verweildauer durchaus positiv

auswirkt, vor allem in bezug auf die Kollagen II-Synthese, die erst nach einer zweiwöchigen Verweildauer messbar beginnt. Allerdings stellten sie, ebenso wie in den hier gezeigten Versuchen, eine relativ konstante Kollagen Typ I-Bildung fest.

4.5. Einfluss von Wachstumsfaktoren

Nachdem bereits die Variation der Kulturbedingungen eine positive Wirkung auf die Redifferenzierung zeigte, sollte eine Applikation von Wachstumsfaktoren zur gezielten Stimulierung der Redifferenzierung und der Chondroneogenese untersucht werden. Aufgrund der Interdependenz zahlreicher Effekte dieser Faktoren ist es wenig hilfreich, die Effekte am Chondrozyten isoliert zu studieren. Daher wurde versucht, von vornherein mit komplexen Systemen zu arbeiten, deren Zusammensetzung auf Grund der Erfahrungen sinnvoll erscheint.

4.5.1. IGF-I unterstützt die Redifferenzierung und die Chondroneogenese

Bei allen Versuchen wurde IGF-I im Kulturmedium supplementiert. Dieser Wachstumsfaktor war einer der ersten, dessen chondrotrophe Eigenschaften beschrieben wurden (Salmon und Daughaday, 1957). IGF zeigt sowohl mitotische wie auch matrixfördernde Wirkungen, wobei die Förderung der Matrixsynthese überwiegt, ausserdem ist dieser Faktor dafür bekannt, die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren zu verstärken (Trippel, 1995; Kato et al., 1983). In bovinen Explantatsystemen konnte nachgewiesen werden, dass IGF-I bereits bei niedrigen Konzentrationen (5-20 ng/ml) den Einbau von radioaktiv markiertem Sulfat stimulierte, die DNA-Synthese jedoch nicht beeinflusste (Osborn et al., 1989; Luyten et al., 1988). IGF-I ist einer der prominenten Wachstumsfaktoren in der Synovialflüssigkeit und im Serum (Schalkwijk et al., 1989). Aus diesen Gründen und wegen Vorversuchen, die gezeigt haben, dass ein Weglassen von IGF-I zu einer deutlichen Verringerung bzw. einer Einstellung der Matrixsynthese führt, wurde IGF-I immer zugegeben, und in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass immer dieselbe Konzentration zugegeben wurde, sind die Ergebnisse der Versuche zu vergleichen, der Einfluss von IGF-I auf die Matrixsynthese und mögliche Interaktionen mit anderen Wachstumsfaktoren (insbesondere TGF-β_1, s. u.) muss jedoch immer in Betracht gezogen werden.

4.5.2. TGF-β_1 beeinflusst den Differenzierungsgrad und die Chondrogeneseleistung der Zellen

Chondrozyten bilden drei Isoformen von TGF: TGF-β_1, TGF-β_2 und TGF-β_3. Diese werden durch verschiedene andere Wachstumsfaktoren reguliert. bFGF stimuliert die Aktivität von TGF-β_1, das in hohem Maße latent vorliegt, hat jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expression. PDGF hingegen stimuliert TGF-β_1 und TGF-β_3 mRNA. Auch autoregulative Effekte sind zu beobachten: TGF-β_1 und TGF-β_2 sind autoinduktiv, TGF-β_3 führt zu einer Erhöhung von TGF-β_1 mRNA (Villiger und Lotz, 1992). Eine Wirkungsweise von TGF liegt darin, dass es die Knorpelbildung reguliert. Vor allem während der Skelettentwicklung kommt den TGFs eine wichtige Rolle zu. Sie regulieren die Formation des Knorpels und vor allem verhindern sie dessen terminale Differenzierung, die Hypertrophierung, die zur Bildung von Knochen führt (Bohme et al., 1995; Ballock et al., 1993; Dieudonne et al., 1994)
Ein weiterer Effekt liegt in der Aufrechterhaltung der Matrix. Morales und Roberts (1988) zeigten, dass die Zugabe von TGF bei Rinderexplantaten dazu führte, dass der GAG-Gehalt gleich blieb, während in der Kontrolle der GAG-Gehalt stark abnahm. Der DNA-Gehalt der Explantate blieb gleich, daher konnte gezeigt werden, dass sich TGF auf den Metabolismus der Chondrozyten auswirkt. In diesem System konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Supplementierung mit TGF eine Stimulierung und Akkumulierung des IGF-Bindungsproteins 2 hervorruft (Morales, 1997). Dieses Protein scheint eine Rolle beim Transport von IGF-I durch bzw. in der Matrix zu spielen und bildet einen Mechanismus, wie die IGFs aus der Synovialflüssigkeit an den Knorpel gebunden werden können (Bhakta et al., 2000). Eine Stimulation der Matrixsynthese in serumfreien Medium durch synergistische Wirkungen von IGF-I und TGF-β_1 konnten auch Yaeger et al. (1997) nachweisen. Es bleibt noch die Frage, ob sich die Wirkung von TGF darüber entfaltet, dass es die Wirkung von IGF verstärkt, oder ob die Regulierung der Bindungsproteine ein Mechanismus ist, durch den redundante Wachstumsfaktoraktivierung vermieden werden soll. Cawston et al. (1999) wiesen nach, dass TGF-β auf die Kollagenase (MMP-1) wirkt, indem es den IL-1 induzierten Abbau durch MMP-1 hemmt, also auch eine chondroprotektive Wirkung hat. Rosado et al. (2002) konnten zeigen, dass die Wirkung von TGF-β_1 auf costochondrale Chondrozyten durch multiple, interagierende Wirkungswege zustande kommt. Diese beinhalten mindestens drei verschieden Signalwege: über Proteinkinase C, über Phospholipase A_2 / Arachidonsäure / Prostaglandin und über Proteinkinase A. Zusätzlich gibt es zwischen diesen Signalwegen verschiedene Interaktionen.

TGF-β_1 stimulierte die Redifferenzierung der Chondrozyten. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden: zunehmende TGF-Konzentrationen inhibierten die Matrixbildung bei gleichzeitiger Stimulierung der Kollagen Typ II-Synthese.

Kollagen I wurde nur in geringem Maße beeinflusst. Der Gehalt an Typ II-Kollagen war in diesem Versuch mit Zellen der achten Passage am höchsten von allen Versuchen. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Yaeger et al. (1997) während der Alginatphase. Dedifferenzierte Zellen (2-3 Passagen) waren durch Zugabe von IGF-I und TGF-β_2 wieder in der Lage, Kollagen II und Aggrecan zu bilden, also zu redifferenzieren. Dagegen wurde in der Kontrolle (nur mit IGF) nur eine basale Kollagen I-Bildung gemessen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Einfluss auf die Kollagenproduktion haben Qi und Scully (1997; 1998) geliefert. Sie konnten für TGF alleine bereits eine Steigerung der mRNA von Aggrecan und α1(II) Prokollagen nachweisen. Bei Mischung des Alginats mit exogenem Kollagen konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Genexpression um einen Faktor zwei erreicht werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Kollagen Typ II selbst einen Einfluss auf die Chondrozyten hat, die es regulieren. Dies steht im Einklang mit dem Konzept der „dynamischen Reziprozität“, die besagt, dass der Chondrozyt die Matrix synthetisiert und gleichzeitig durch sie in seinem Metabolismus reguliert wird (Sporn und Roberts, 1992).
Auch Bradham und Horton Jr. (1998) wiesen eine Redifferenzierung von Kaninchen- und humanen Chondrozyten nach, die unter dem Einfluss von TGF-β erreicht wurde. Lafyatis et al. (1989) zeigten, dass TGF-β die Kollagenbildung induziert.

In der HD-Kultur führte die Zugabe von TGF zu einer Erhöhung der Matrixproduktion und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Kollagenexpression. Hiervon waren sowohl Typ I, als auch Typ II Kollagene betroffen. Interessanterweise kehrten sich die Verhältnisse, die im Alginatsystem in Bezug auf die Matrixsynthese beobachten wurden, während der Weiterbehandlung in der HD-Kultur um. Hier zeigten sich erneut die Auswirkungen einer erfolgten Redifferenzierung. Eine niedrige Konzentration von TGF während der Alginatphase führte in den Pellets nur zu einer geringen Steigerung (ca. 25 % bei 1 ng/ml) der Matrixproduktion, während hohe Konzentrationen dazu führten, dass in den Pellets bei 20 ng/ml etwa 700 % mehr Matrix gebildet wurde. Auch andere Untersuchungen zeigten ähnliche Steigerungen. Jakob et al. (2001) wiesen nach, dass bei einer Proliferation von Chondrozyten in mit bFGF und TGF-β_1 supplementiertem Medium zunächst eine starke Dedifferenzierung erfolgte. Bei der folgenden Kultur in high-density-pellets in serumfreien Medium, dem TGF und Dexamethason zugegeben war, fand eine sehr starke Neubildung von Kollagen II und Aggrecan mRNA statt, und die gebildeten Gewebe hatten sehr hohe GAG- und Kollagen II-Werte. Bei Explantaten vom Rind zeigten Morales und Roberts (1988) eine Dosisabhängigkeit für den Einfluss von TGF-β_1 auf die Matrixsynthese. Bei 10 ng wiesen sie eine 6,6-fache Steigerung der Proteoglykansynthese nach.
Es konnte bestätigt werden, dass TGF in der Redifferenzierungsphase und während der Chondrogenese eine wichtige Rolle, vor allem in Bezug auf die Kollagensynthese, spielt. Ein

weiterer, ebenso wichtiger Einfluss ist die konzentrationsabhängige Stimulation der Matrixsynthese, die durch die Zugabe während der Redifferenzierung erreicht wird. Während der Redifferenzierung wird die Matrixbildung mit zunehmender Konzentration reduziert, in der nachfolgenden Chondrogenese signifikant stimuliert. Außerdem konnte die Multifunktionalität von TGF bestätigt werden, da die Wirkungsweise dieses Faktors stark vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig ist. Dedifferenzierte Zellen werden redifferenziert, differenzierte leicht mitogen stimuliert. Die Unterstützung der Synchronisation der Chondrozyten zu einem einheitlichen Differenzierungsgrad wird damit ermöglicht. Sie unterbindet widersprüchliche Signale der von den Chondrozyten sezernierten Faktoren und führt zu einer erhöhten Rezipienz der Zellen für die artifiziellen, von aussen zugegebenen Cytokine.

4.5.3. Interleukin-4 stimuliert die Bildung von Proteoglykanen

Die Zugabe von Interleukin-4 führte generell zu einer Stimulierung der Matrixbildung (Kap. 3.7.1). Bei 21 % O_2 war die Steigerung unabhängig von der Passagenzahl und der Vorbehandlung der Zellen zu beobachten. Auch die Matrixproduktion während der Redifferenzierung wurde stimuliert (Kap. 3.5.3.1). Eine dosisabhängige Wirkung von Interleukin-4 konnte während der Redifferenzierung in Bezug auf die Kollagen II-Synthese nachgewiesen werden: Mit zunehmender Konzentration stieg der Gehalt an Kollagen II, die Kollagen I-Expression nahm ebenfalls leicht zu. Dies scheint ein synergistischer Effekt zu sein. Die Zugabe von TGF führt zu einer Redifferenzierung der Zellen und macht sie damit für Interleukin-4 zugänglich. IL-4 unterstützt die laufende Chondrogenese vor allem in Hinblick auf die Proteoglykansynthese, kann sie aber offensichtlich nicht induzieren.

Interleukin 4 gehört zu den Zytokinen, die antiinflammatorisch wirken. Es wirkt unter anderem hemmend auf proinflammatorische Zytokine, die von Monozyten gebildet werden, hat einen Wachstumsfördernden Einfluss auf T-Lymphozyten und fördert die Proliferation von B-Lymphozyten und deren Immunglobulinproduktion (Isomäki und Punnonen, 1997).

Es inhibiert in vitro die Resorption von Knochen (Watanabe et al., 1990; Miossec et al., 1994) und hat auch auf andere Zelltypen modulierende Wirkung (Salter et al., 1996). In Mastzellen konnten Bradding et al. (1992) zeigen, dass Interleukin-4 als Speicherform vorliegt, die bei Aktivierung schnell freigesetzt werden kann.

Aber auch in gesundem Knorpel kommt Interleukin-4 eine wichtige Rolle zu: als Mediator der Mechanotransduktion. So gibt es einige Hinweise darauf, dass in humanem Knorpel α_5 β_1-Integrine als „Erkenner“ von mechanischer Belastung fungieren (Wright et al., 1997; Millward-Sadler et al., 1999; Loeser et al., 1995; Ingber, 1997). Salter et al. (2001) zeigten für humane Chondrozyten den in Abbildung 64 dargestellten Mechanismus der Mechanotransduktion. Dieser umfasst z.B. Änderungen im Membranpotential (Wright et al., 1997), Interleukin-4 Freisetzung (Millward-Sadler et al., 1999) und eine Erhöhung der mRNA

von Aggrecan, sowie einer Erniedrigung von MMP-3 (Stromelysin) mRNA (Millward-Sadler et al., 2000). Eine mechanische Belastung von Rinderknorpel führt zu einer Erhöhung der mRNA für Aggrecan und ebenfalls zu einer Erhöhung der Proteoglykansynthese (Lai et al., 1991; Maroudas et al., 1992).

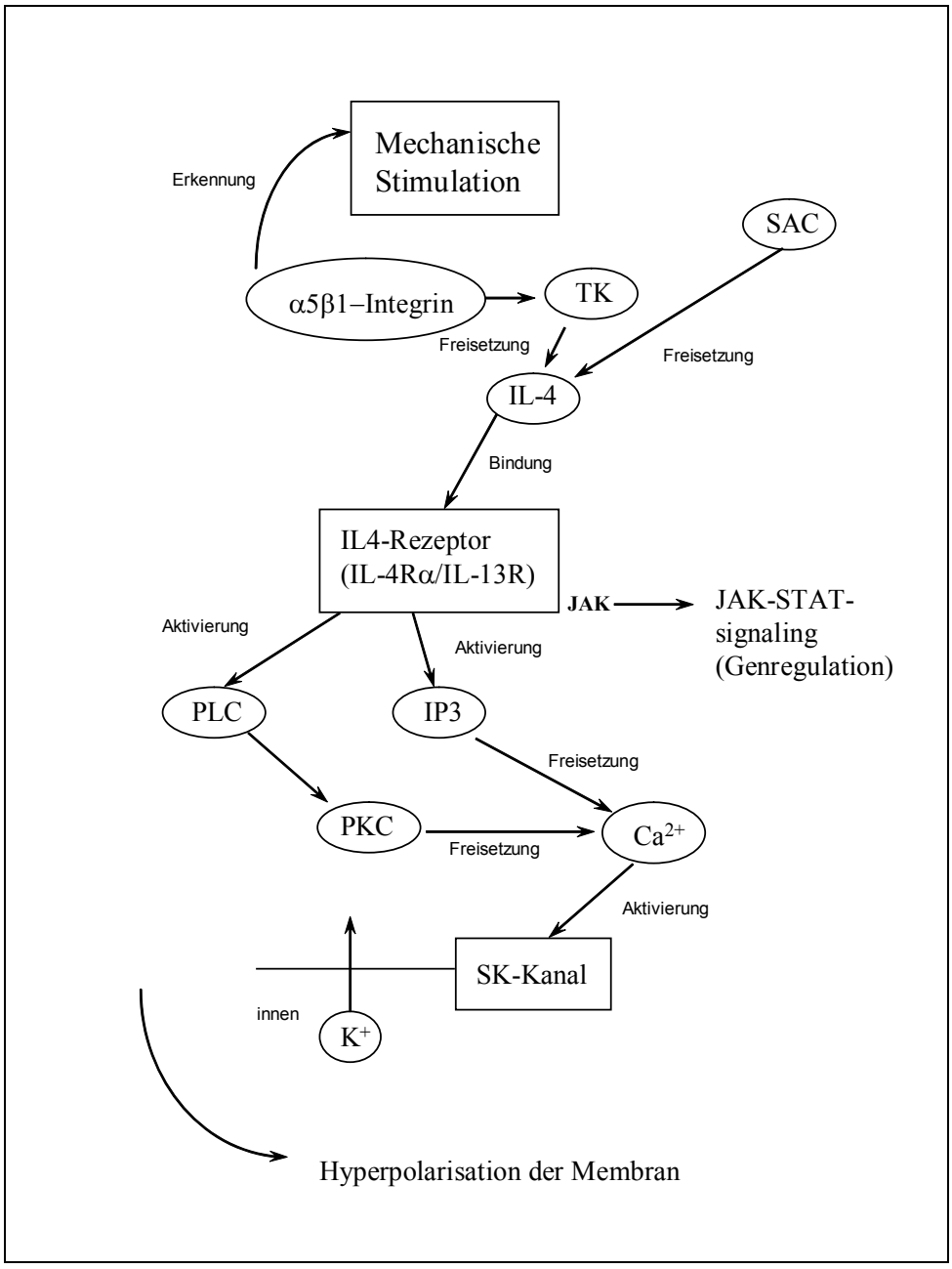


Abbildung 64: Signalwege der Mechanotransduktion in humanen Chondrozyten, die mechanisch stimuliert wurden. TK = Tyrosinkinase, SAC = Dehnungs-aktivierte (*stretch activated*) Ionenkanäle, IL-4 = Interleukin-4, IL-4Rα = Interleukin-4 Rezeptor α Untereinheit, IL-13R = Interleukin 13 Rezeptor Untereinheit, PLC = Phospholipase C, IP3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat, PKC = Proteinkinase C, SK-Kanal = Calcium-aktivierter Kalium-Kanal (*small conductance calcium-activated potassium channel*). Verändert nach Millward-Sadler et al. (1999) und Salter et al. (2001).

Die chondroprotektive Wirkung von Interleukin-4 kommt durch eine Regulierung des MMP/TIMP-Verhältnisses zustande. Die MMPs (Matrixmetalloproteinasen) sind zinkhaltige Proteinasen, die alle Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen können. Sie werden als Proenzyme gebildet, die Aktivierung erfolgt erst nach Verlassen der Zelle (von der Mark et al., 1977). Der Abbau von Proteoglykanen erfolgt recht schnell und ist teilweise reversibel, der von Kollagen zeitverzögert und irreversibel. Der Abbau von Kollagen ist einer der Effekte, der bei Osteoarthritis zu beobachten ist. Die extrazelluläre Aktivität der MMPs wird durch die TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) reguliert, die die Aktivität der MMPs durch Komplexbildung blockieren (Cawston et al., 1981). Im gesunden Knorpel bilden diese Enzyme ein Gleichgewicht, sodass der Knorpel nicht abgebaut wird. Interleukin-4 wirkt dadurch chondroprotektiv, dass es die Bildung der MMPs reduziert und damit das Verhältnis von MMPs zu TIMPs zugunsten der blockierenden Effekte der TIMPs verschiebt. Die Wirkung erfolgt nicht durch Hochregulierung der TIMPs (Cawston et al., 1999; Nemoto et al., 1997). Die genaue Wirkungsweise ist noch nicht geklärt, da Shingu et al. (1995) eine Regulation der TIMPs durch IL-4 nachweisen konnten, während MMP-3 nicht reguliert wurde. Die Messung wurde allerdings an Chondrozyten vorgenommen, die aus Gewebe mit rheumatoider Arthritis stammten. Inzwischen häufen sich die Hinweise darauf, dass bei arthritischem Gewebe eine Änderung der Wirkungsweisen der beteiligten Enzyme stattfindet und dass dadurch auch IL-4 einen anderen Einfluss hat, als bei gesundem Gewebe. Die Änderung der Signalwege bezieht sich z.B. auf eine Änderung der Integrinexpression (Lapadula et al., 1997) und eine Expression antiadhäsiver Moleküle wie Fibronectin (Chevalier et al., 1996), sowie eine Änderung der elektrophysiologischen Antworten der Chondrozyten (Millward-Sadler et al., 1999).

All diese Effekte wurden durch die Zugabe von Interleukin-4 zu den kultivierten Chondrozyten ausgenutzt. Zum einen wird der Degradation der gebildeten Matrix entgegengewirkt, indem die chondroprotektiven Eigenschaften von IL-4 ausgenutzt werden, zum anderen wird den Chondrozyten eine mechanische Belastung „suggeriert“. Dass die Zunahme der Matrixbildung tatsächlich daher kommt, lässt sich postulieren, da die Effekte einer zyklischen Belastung der beobachteten Zunahme an Proteoglykanen ähnlich sind (Lai et al., 1991; Maroudas et al., 1992). Der Einfluss von Interleukin-4 auf die Redifferenzierung scheint marginal zu sein. Er steht im untersuchten Konzentrationsbereich hinter anderen Faktoren (z.B. TGF) deutlich zurück.

4.5.4. PDGF-BB wirkt permissiv, unterstützt die Redifferenzierung und interagiert mit Interleukin-4

Es zeigte sich, dass PDGF unterschiedliche Effekte hatte, je nach dem Zeitpunkt der Supplementierung des Kulturmediums. Wurde PDGF-BB während der Proliferation zugegeben, wirkte sich diese Zugabe während der Alginatkultur dadurch aus, dass die Zellen mehr Matrix bildeten. Die Kollagen Typ I und II-Produktion war jedoch nur bei den Ansätzen ausgeprägt, in denen ebenfalls PDGF supplementiert war. Während der Chondrogenese wurde weniger Matrix und mehr Kollagen Typ II gebildet als bei Ansätzen, die mit bFGF proliferiert wurden. Unabhängig von der Behandlung mit anderen Faktoren war die Zunahme der gebildeten Matrix während der Chondrogenese deutlich geringer als bei einer Proliferation mit bFGF.

Wie schon in Kapitel 1.3.5 erwähnt, gehört PDGF zu den Faktoren, die Zellen kompetent machen können (Stiles et al., 1979). Diese Einflussnahme auf die Zellen ist hier deutlich zu beobachten, da sich die Ergebnisse deutlich unterscheiden. Zusätzlich zu den beobachteten mitogenen Effekten (z. B. Rydziel et al., 1994; Benz et al., 2002; Facchiano et al., 2000) wurde bereits nachgewiesen, dass eine Vorbehandlung mit PDGF-BB bei Implantaten aus PLA/PGA dazu führt, dass einerseits die gebildete Knorpelfläche zunimmt und andererseits der Hypertrophiegrad der Zellen reduziert wird (Lohmann et al., 2000b). Jakob et al. (2001) konnten zeigen, dass sich die Expansion mit bestimmten Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF-BB und FGF-2 / TGF-β_1) nicht nur auf die Proliferation und Dedifferenzierung, sondern auch auf das Potential der Zellen auswirkt, zu redifferenzieren und auf spezifische regulatorische Moleküle zu reagieren. Dieser „permissive“ Effekt war vor allem in Bezug auf die Kollagen II-Synthese zu beobachten. Die Matrixsynthese wurde nicht stimuliert, der Einfluss von Interleukin 4 auf die Matrixsynthese wurde sogar durch die Zugabe von PDGF-BB verringert bzw. ausgeschaltet. Diese Tatsache ist ein Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen Interleukin-4 und PDGF-BB.
Wechselwirkungen von TGF-β_1 mit der Regulation des PDGF-B Gens sind für Osteoblasten beschrieben worden (Rydziel und Canalis, 1996). Bei diesen Zellen wurde außerdem eine Autoinduktion des PDGF-A Gens durch PDGF-AA und PDGF-BB festgestellt. Eine Inhibierung der Proteinkinase C führte nicht zu einer Blockierung dieser Autoinduktion (Rydziel et al., 1994). Über diesen Weg scheint die Wechselwirkung zwischen PDGF und IL-4 nicht stattzufinden. Durch mechanische Belastung konnten Wilson et al. (1993) bei vaskulären glatten Muskelzellen zeigen, dass PDGF das Wachstum der Zellen über eine autokrine Regulation erhöhte. Wenn PDGF also auf mechanische Belastung reagiert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass potentiell eine Interaktion der Regulation von PDGF mit der von Interleukin 4 gegeben sein könnte. Es sind nur wenige Wechselwirkungen von

PDGF-BB und IL-4 bekannt. In glatten Muskelzellen der Aorta verstärkt beispielsweise Interleukin-4 den Effekt von PDGF auf den Urokinase Plasminogen Aktivator, während in Zelllysaten keine Modulation stattfindet (Wang et al., 1998). Allerdings konnten Patel et al. (1996) belegen, dass sowohl in der Signaltransduktion von PDGF, als auch von IL-4 Stat6 und Jak1 vorhanden sind.
Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass eine Proliferation mit PDGF-BB die Chondrozyten in bestimmten Bereichen in einem Zustand halten, der dem von primären Zellen ähnelt. Guicheux et al. (2002) konnten nämlich zeigen, dass IL-4 in primären Chondrozyten keine Wirkung zeigt, da der IL-4 Rezeptor in frisch isolierten Zellen nicht vollständig ausgebildet wird.

Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus dem Nachweis von *smooth muscle actin* (SMA) in humanem Knorpel (Kim und Spector, 2000; Wang et al., 2000). Dieses Aktin führt dazu, dass sich die Chondrozyten kontrahieren können. Die Bedeutung dieser SMA-induzierten Kontraktion von Chondrozyten ist noch nicht geklärt und Gegenstand intensiver Forschung. Aydelotte und Kuettner (1988) schlugen vor, dass sie eine große Rolle bei der Modellierung der ECM-Bestandteile spielt. Zaleskas et al. (2001) untersuchten den Einfluss von PDGF-BB und TGF-β_1 auf die Ausprägung der SMA-Bildung in humanen Chondrozyten und konnten zeigen, dass eine Behandlung mit TGF eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft bewirkte, während eine PDGF-Zugabe zu einer Verringerung der Kontraktion führte. Unter dem Aspekt der Modellierung der extrazellulären Matrix könnte diese Wirkungsweise von PDGF-BB erklären, warum in Bezug auf die Matrixsynthese eine Verringerung unter dem Einfluss von PDGF stattfand.
Zusätzlich wiesen Chen et al. (1992) für mesodermale Zellen aus der Exremitätenknospe des Huhns während der Differenzierung nach, dass eine frühe Inkubation mit PDGF zu einer drastischen Reduzierung (4 % des Wertes der Kontrolle für PDGF-AB, 11 % des Kontrollwertes für PDGF-BB) des Einbaus von [^{35}S] Sulfat in die Proteoglykane führte. Eine spätere Inkubation, als die Differenzierung bereits eingesetzt hatte, zeigte keine Wirkung. Eine Zugabe von BMP-2 konnte die Wirkung von PDGF-AB aufheben.
Dieser Effekt konnte ebenfalls bei der durchgängigen PDGF-Supplementierung beobachtet werden. Wurden die Chondrozyten nur mit bFGF proliferiert, wirkte sich die Zugabe während der Redifferenzierung positiv auf die Matrixsynthese aus. In Kombination mit IGF-I und TGF-β_1 wurde außerdem der höchste Kollagen II-Gehalt gemessen. Bei weitergehender Behandlung fand jedoch ein Abbau der Matrix statt, die Zellzahlen nahmen leicht ab und das Kollagen, das in den Pseudochondronen nachgewiesen wurde, war nicht mehr nachweisbar. In diesem Fall wurden die Pellets durchgängig mit derselben Faktorenkombination behandelt, und die Kontrolle, die nicht mit PDGF behandelt wurde, zeigte auch während der

Chondrogenese eine leichte Zunahme der Matrixbildung, jedoch keine Bildung von Kollagen II. Gegenüber der Kontrolle bildeten die mit PDGF-BB kultivierten Pellets nur zwischen 13 und 26 % des GAG-Gehaltes der Matrix.

Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen konnten Lohmann et al. (2000b) nachweisen, dass eine Vorbehandlung mit PDGF-BB vor einer Implantation in Nacktmäuse eine zeitabhängige Steigerung der Matrixsynthese bewirkte. Chondrozyten, die 4 Stunden mit PDGF behandelt wurden, bildeten mehr Matrix als Zellen, die 24 Stunden mit diesem Faktor vorbehandelt wurden. Vier Wochen nach der Implantation zeigte der neu gebildete Knorpel eine geringere Matrixbildung als die Kontrolle, nach 8 Wochen wurden jedoch deutlich höhere Werte erreicht. Daher besteht die Möglichkeit, dass sich die Vorbehandlung mit PDGF-BB erst bei längerer Kultivierung sichtbar auswirkt. Weitere Untersuchungen müssen hier noch folgen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit zeigten einen stimulierenden Einfluss von PDGF-BB auf die Kollagensynthese. Der Effekt war bei unterschiedlichen Passagen zu beobachten, mit zunehmender Konzentration wurde mehr Kollagen Typ II gebildet. Der Kollagen Typ I-Gehalt nahm ebenfalls zu. Eine Zunahme der Kollagen Typ II-Bildung bestätigt eine Redifferenzierung der Chondrozyten. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass PDGF-BB vor allem die Kollagenbildung positiv beeinflusst, während die Matrixbildung eher gehemmt wird. Diese Hemmung kann bei Zugabe während der Chondroneogenese soweit führen, dass die Matrixsynthese nahezu vollständig unterbleibt.

4.6. Parameter für die Beurteilung des erreichten Grades der Redifferenzierung und der Knorpelpellets

Die während der Redifferenzierungsphase gebildeten Hauptbestandteile des Knorpels (Kollagen und GAG) sind nur sehr bedingt zur Beurteilung der Eignung von Zellkulturbedingungen zur Förderung der Redifferenzierung geeignet: Ein Beispiel dafür ist die durchgängige Behandlung mit PDGF während der Redifferenzierung und der Chondrogenese. Hier wurden nach der Alginatphase gute GAG-Werte erreicht, in den resultierenden Pellets war jedoch kaum noch GAG nachzuweisen. Der Einfluss der TGF-Konzentration ist ein weiteres Beispiel: Während in der Alginatphase eine hohe TGF-Konzentration zu einer Abnahme der Matrixproduktion führte, wurde in der HD-Kultur bei diesem Ansatz am meisten Matrix gebildet.

Die induzierte Redifferenzierung erfasst mit Sicherheit nicht alle Zellen. In nativem Knorpel liegt der Gehalt an Kollagen II deutlich über den Werten, die bei den Pellets erreicht wurden. Auch der Gehalt an Kollagen I ist in den hergestellten knorpelartigen Stückchen höher als bei nativem Knorpel, in dem meistens kein Kollagen I nachgewiesen werden kann. mRNA von Kollagen I und III wurde zwar auch in nativem Knorpel nachgewiesen (Treilleux et al., 1992; Kolettas et al., 1995), dieses Vorkommen bedeutet aber nicht notwendigerweise auch eine Expression von Kollagen, da z.B. bei Hühner-Chondroblasten durch translationale Kontrolle kein Kollagen I ausgebildet wird, obwohl mRNA vorhanden ist (Bohme et al., 1995).
Die Zunahme der Matrixbildung und des G/D-Verhältnisses deuten auf eine gute Redifferenzierung hin, da mit zunehmender Verweildauer mehr Matrix von der gleichen Zellzahl gebildet wird. In nativem Knorpel des Femurkopfes befinden sich nur 10000 Zellen / mm^3 (Venn und Maroudas, 1977). Je größer also das G/D-Verhältnis wird, desto näher kommt es an natürliche Verhältnisse heran.
Für Rinderknorpel ergibt sich ein G/D-Verhältnis von etwa 134 (GAG: 1102 µg, DNA: 8,4 µg, Gewicht: 40 mg), beim Schwein wurde ein G/D-Verhältnis von 123 gemessen**,** bei humanem nativen Knorpel liegt das Verhältnis bei etwa 114 (GAG: 965 µg, DNA: 8,6 µg, Gewicht: 55 mg; Mittelwerte, n=4, eigene Daten). Von solchen Werten sind die hergestellten Pellets noch deutlich entfernt, gegenüber der HD-Kultur sind die Verhältnisse jedoch schon bedeutend besser geworden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass während der Alginatphase gezielt Redifferenzierungssignale gegeben werden können, so dass ein Grossteil der Zellen synchron redifferenziert. Im 2-Phasen-System ist diese gezielte Redifferenzierung nicht möglich, es bildet sich eine Mischung aus unterschiedlich weit redifferenzierten Zellpopulationen, die sich wahrscheinlich auch noch durch unterschiedliche Signale (Proliferation – Chondrogenese) wechselseitig beeinflussen. Auch das Differenzierungspotential der Chondrozyten an sich scheint sich zu unterscheiden. Barbero et al. (2003) und Tallheden et al. (2003) wiesen für dedifferenzierte humane Chondrozyten nach, dass ein Teil der Zellen in der Lage ist, ähnlich wie mesenchymale Stammzellen osteogen, chondrogen und adipogen zu differenzieren, während ein anderer Teil nur chondrogen und ein weiterer überhaupt nicht differenziert. Diese Plastizität einer Population von Chondrozyten muss hinsichtlich des Ziels der Synchronisation beachtet werden.
Das Gewicht der gebildeten Knorpelpellets kann bedingt als Indikator für die phänotypische Qualität des Knorpels herangezogen werden. Die Interdependenz des Glykosaminoglykan-, Kollagen- und Wassergehaltes bestimmt das Feuchtgewicht. Die Bildung eines Kollagennetzwerks führt bei steigenden GAG-Gehalten zu niedrigerem Gewicht. Fehlende Vernetzung führt zu einem proportionalen Anstieg des Feuchtgewichts mit zunehmendem GAG-Gehalt. Unter Einfluss von BMP-7 wurden vor kurzem Knorpelpellets gezüchtet, die bei

hohem Gehalt von Glykosaminoglykanen ein Gewicht über 100 mg aufwiesen, allerdings konnte kaum Kollagen Typ II nachgewiesen werden (pers. Mitt. Goepfert).

4.7. Implikationen der Ergebnisse für tissue-engineerten Knorpel

Das Hauptproblem des humanen *in vitro*-Systems besteht darin, dass ein großer Anteil an Kollagen Typ I gebildet wird, der im nativen Knorpel nicht in diesem Ausmaß vorhanden ist. Mit den dargestellten Ergebnissen können erste Hinweise darauf gegeben werden, wie sich die Produktion von Kollagen Typ I eventuell regulieren lässt, vor allem die Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks hatte einen deutlichen Einfluss auf die Kollagen Typ I-Synthese.
Die Einführung der Redifferenzierungsphase (Alginat) in das Kultursystem führt zu weitreichenden Folgen: die Chondrozyten können in drei Phasen mit unterschiedlichen Faktoren kultiviert werden, die den jeweils erwünschten Einfluss auf die Zellen zeigen (Tabelle 9). Die Vorteile des 3-Phasen-Systems liegen in der Nutzbarmachung von permissiven Effekten, der Stimulierung mittels Differenzierungssignalen und einer Erhöhung der Suszeptibilität der Gesamtzellpopulation für chondrogene Faktoren.

Tabelle 9: Vergleich der Kulturbedingungen und Stimulierungsmöglichkeiten der angewendeten Modelle. Die Einführung der dritten Phase führt zu einer signifikanten Erhöhung der einsetzbaren Stimuli. O_2 ↓ oder ↑ = Reduzierung bzw. Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes in der Gasphase.

2-Phasen-System		**3-Phasen-System**	
Kulturbedingungen Effekt	Stimulierung durch	Kulturbedingungen Effekt	Stimulierung durch
Adhäsion Proliferation	bFGF	Adhäsion Proliferation	bFGF, PDGF-BB
		Alginatkultur Redifferenzierung, Synchronisation	IGF-I, TGF-β_1, PDGF-BB, O_2 ↓
HD-Kultur Chondroneogenese	IGF-I, TGF-β_1, IL-4	HD-Kultur Chondroneogenese	IGF-I, TGF-β_1, IL-4, O_2 ↑

Die für eine klinische Anwendung nötige Stimulierung der Zellen kann in größerem Maße stattfinden, und eine gezielte Untersuchung des Einflusses bestimmter Faktoren auf die einzelnen Bereiche der *in vitro*-Kultivierung wird durch dieses System begünstigt. Allerdings

muss ein solcher Test 1. auch auf die folgenden Phasen erweitert werden und 2. sind diese Tests recht aufwendig und vor allem langwierig. Dadurch, dass es sich hier um ein multifaktorielles System handelt, sind auch Vorhersagen über den Einfluss bestimmter Parameter nicht zu treffen, sondern müssen experimentell bestimmt werden.
Ein weiterer Vorteil des 3-Phasen-Systems gegenüber dem 2-Phasen-System liegt darin, dass eine deutliche Verringerung der Zellzahl erreicht werden konnte. Die meisten Versuche im Alginat wurden mit $5*10^5$ Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse lagen, wie beschrieben, in allen Fällen über denen der HD-Kultur, die mit einer höheren Startzellzahl begonnen wurden ($1\text{-}2*10^6$ Zellen).
Diese Vorteile bestätigen die Relevanz der Einführung einer Redifferenzierungsphase. Die Kultur der humanen Chondrozyten in Alginat hat sich für dieses Ziel als geeignet herausgestellt. Die deutliche Erhöhung der Möglichkeit zur Variation der Kulturbedingungen zeigt, dass dieses System ein hohes Potential für die Etablierung einer Methode zur Knorpelherstellung *in vitro* besitzt, das Voraussetzung für eine klinische Anwendung ist.

Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um das 3-Phasen-System zu optimieren. Eine Möglichkeit besteht darin, die physiologische Umwelt des Knorpels besser abzubilden, indem man z. B. die Osmolarität erhöht. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Belastung. Valhmu et al. (1998) konnten bereits zeigen, dass eine kurzzeitige Belastung die mRNA von Aggrecan hochreguliert, während eine statistische Belastung gegenüber der Kontrolle zu keiner Erhöhung führte. In Versuchen von Sah et al. (1989) führte eine statische Belastung zu einer Reduzierung der Proteoglykansynthese, die auch bei Immobilisierung des Kniegelenks nachweisbar, jedoch reversibel, ist (Behrens et al., 1989; Tammi et al., 1983). Die Bedingungen in der Zellkultur entsprechen eher dem Typ der Immobilisierung, also einer mechanischen Unterbeanspruchung des Knorpels. Eventuell werden durch Belastungsexperimente auch die Wirkungen von Wachstumsfaktoren verändert, ein Kandidat dafür ist besonders Interleukin-4. Dabei ist es jedoch nicht sinnvoll, einzelne Chondrozyten oder Monolayer zu belasten, da sich dadurch zwar Ergebnisse über die Elektrophysiologie der Zellen erreichen lassen (Millward-Sadler et al., 1999; Salter et al., 2001), diese jedoch wenig Aussagekraft darüber haben, wie und ob sie die Chondrogenese unterstützen. Auch eine Änderung der Temperatur, die sich stimulierend auf die Zellviabilität und die Proteoglykansynthese auswirkt (Hojo et al., 2003), ist denkbar.

5. Zusammenfassung

Hyaliner Gelenkknorpel hat aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften und seiner Architektur nur eine geringe Fähigkeit zur Regeneration. In der klinischen Anwendung sind einige Verfahren etabliert, die aber keine vollständige Defektreperatur ermöglichen. Mit Hilfe des Tissue-Engineering ergeben sich neue Möglichkeiten, *in vitro* Knorpel für eine Implantation zu züchten.

Anhand der Bestimmung der Matrixbildung (über den Gehalt an Chondroitinsulfat), der Zellzahl und immunologischer und immunohistochemischer Analyse der Kollagenbildung wurden in vitro gezüchtete Knorpelpellets auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

Die Proliferation der humanen Chondrozyten ist unter definierten Bedingungen leicht möglich, jedoch verändern die Zellen durch die Passagierung ihren Phänotyp und dedifferenzieren. Es bilden sich gemischte Populationen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden der Zellen.

Ein 2-phasiges Kultursytem, in dem die Chondrozyten direkt nach der Proliferation zur Chondrogenese in high-density-Kultur angeregt werden, funktioniert zwar in tierischen Systemen, versagt jedoch im humanen System. Durch die Einführung eines Redifferenzierungsschrittes (Alginatsystem) ist es möglich, die Zellen sukzessive dazu zu veranlassen, die Proliferation zu beenden und sich auf die Chondrogenese vorzubereiten. Eine Stimulierung der Redifferenzierung durch eine Synchronisation der Chondrozyten auf einen einheitlichen Differenzierungsgrad konnte am Beispiel von Kulturbedingungen, etwa einer Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes und durch Vermeidung von Zell-Zell-Kontakten, gezeigt werden. Diese Synchronisation führt gegenüber dem 2-Phasen-System zu einer signifikant höheren Chondrogenesefähigkeit der Zellen.

Am Beispiel einer Reihe von Wachstumsfaktoren konnte als weiterer Vorteil gezeigt werden, dass durch die Einführung der Redifferenzierungsphase zusätzlich zu den direkten Effekten auch permissive Wirkungen dieser Faktoren genutzt werden können.

Das Ziel der Etablierung des 3-Phasen-Systems wurde erreicht, eine Optimierung in Hinblick auf eine klinische Anwendung muss noch folgen.

6. Literaturverzeichnis

Abukawa, H., Terai, H., Hanouche, D., Vacanti, J.P., Kaban, L.B. und Troulis, M.J. (2003). Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery *61*, 94-100.

Afoke, N.Y., Byers, P.D., und Hutton, W.C. (1987). Contact pressures in the human hip joint. The Journal of Bone and Joint Surgery *69*, 536-41.

Ap Gwynn, I., Wade, S., Kaab, M.J., und Owen, G.R. (2000). Freeze-substitution of rabbit tibial articular cartilage reveals that radial zone collagen fibres are tubules. Journal of Microscopy *197*, 159-172.

Aulthouse, A.L., Beck, M., Griffey, E., Sanford, J., Arden K., Machado, M.A., und Horton, W.A. (1989). Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. In Vitro Cellular and Developmental Biology *25*, 659-668.

Aydelotte, M.B. und Kuettner, K.E. (1988). Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. Connective Tissue Research *18*, 205-222.

Aydelotte, M.B., Schmid, T.M., Greenhill, R.R., Luchene, L., Schumacher, B.L., und Kuettner, K.E. (1992). Synthesis of collagen by cultured bovine chondrocytes derived from different depths of articular cartilage. Orthoped. Res. Soc. Trans. *16*, 26

Ballock, R.T., Heydemann, A., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., und Sporn, M.B. (1993). TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. Developmental Biology *158*, 414-29.

Barbero, A., Ploegert, S., Heberer, M. und Martin I. (2003) Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes.

Baserga, R. (1989). Measuring parameters of growth. In Cell growth and division - a practical approach. R. Baserga, ed. (Eynsham, Oxford: . IRL-Press), pp. 1-16.

Beaver, R.J., Mahomed, M., Backstein, D., Davis, A., Zukor, D.J., und Gross, A.E. (1992). Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee: a survivorship analysis. The Journal of Bone and Joint Surgery *74 B*, 105-110.

Behrens, F., Kraft, E.L., und Oegema, T.R. Jr (1989). Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. Journal of Orthopaedic Research *7*, 335-43.

Benya, P.D. und Shaffer, J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose. Cell *30*, 215-224.

Benz, K., Breit, S., Lukoschek, M., Mau, H., und Richter, W. (2002). Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. Biochemical and Biophysical Research Communications *293*, 284-292.

Bergmann, G., Graichen, F., und Rohlmann, A. (1993). Hip joint loading during walking and running, measured in two patients. Journal of Biomechanics *26*, 969-990.

Bert, J.M. (1997). Abrasion arthroplasty. Operative Tech Orthop *7*, 294-299.

Bert, J.M. und Maschka, K. (1989). The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthoisis. Journal of Arthroscopy *5*, 25-32.

Bhakta, N.R., Garcia, A.M., Frank, E.H., Grodzinsky, A.J., und Morales, T.I. (2000). The insulin-like growth factors (IGFs) I and II bind to articular cartilage via the IGF-binding proteins. The Journal of Biological Chemistry *275*, 5860-5866.

Blunk, T., Sieminski, A.M., Gooch, K.J., Courter, D.L., Hollander, A.P., Nahir, A.M., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., und Freed, L.E. (2002). Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. Tissue Engineering *8*, 73-84.

Bohme, K., Winterhalter, K.H., und Bruckner, P. (1995). Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. Experimental Cell Research *216* , 191-8.

Bonaventure, J., Kadhom, N., Cohen-Solal, L., Ng, K.H., Bourgouignon, J., Lasselin, C., und Freisinger, P. (1994). Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Experimental Cell Research *212*, 97-104.

Bosserhoff, A.K. und Buettner, R. (2003). Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. Biomaterials *24*, 3229-3234.

Bradding, P., Feather, I.H., Howarth, P.H., Mueller, R., Roberts, J.A., Britten, K., Bews, J.P., Hunt, T.C. , Okayama, Y., und Heusser, C.H. (1992). Interleukin 4 is localised to and released by human mast cells. Journal of Experimental Medicine *176*, 1381-1386.

Bradham, D.M. und Horton Jr., W.E. (1998). In vivo cartilage formation from growth factor modulated articular chondrocytes. Clinical Orthopaedics and Related Research *352*, 239-249.

Breinan, H.A., Minas, T., und Barone, L.M. (1998). Histological evaluation of the course of healing of canine articular cartilage defects treated with cultured autologous chondrocytes. Tissue Engineering *4*, 101

Brighton, C.T. und Happenstall, R.B. (1971). Oxygen tensions in zones of epiphyseal plate metaphysis and diaphysis. The Journal of Bone and Joint Surgery *53A*, 719-728.

Buckwalter, J.A. und Mankin, H.J. (1997a). Articular cartilage. Part I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. The Journal of Bone and Joint Surgery *79A*, 600-611.

Buckwalter, J.A. und Mankin, H.J. (1997b). Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. The Journal of Bone and Joint Surgery *79A*, 612-632.

Buckwalter, J.A. und Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis and Rheumatism *41*, 1331-1342.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Annual Review of Biochemistry *58*, 79-110.

Cawston, T.E., Billington, C., Cleaver, C., Elliott, S., Hui, W., Koshy, P., Shingleton, B., und Rowan, A. (1999). The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. Annals of the New York Academy of Sciences *878*, 120-129.

Cawston, T.E., Galloway, W.A., Mercer, E., Murphy, G., und Reynolds, J.J. (1981). Purification of a rabbit bone inhibitor of collagenase. Biochemical Journal *195*, 159-165.

Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Hirochika, R. und Tateishi, T. (2003). Redifferentiation od dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. FEBS Letters *542*, 95-99.

Chen, P., Carrington, J.L., Paralkar, V.M., Pierce, G.F., und Reddi, A.H. (1992). Chick limb bud mesodermal cell chondrogenesis: inhibition by isoforms of platelet-derived growth factor and reversal by recombinant bone morphogenetic protein. Experimental Cell Research *200*, 110-117.

Chevalier, X., Claudepierre, P., Groult, N., Zardi, L., und Hornebeck, W. (1996). Presence of ED-A containing fibronectin in human articular cartilage from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The Journal of Rheumatology *23*, 1022-1030.

Chow, G., Knudson, C.B., Homandberg, G., und Knudson, W. (1995). Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators. Journal of Biological Chemistry *270*, 27734-27741.

Chubinskaya, S., Huch, K., Schulze, M., Otten, L., Aydelotte, M.B., und Cole, A.A. (2001). Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Journal of Histochemistry and Cytochemistry *49*, 1211-1219.

Clar, C.C., Tolin, B.S., und Brighton, C.T. (1991). The effect of oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. Journal of Orthopaedic Research *9*, 477-484.

Dieudonne, S.C., Semeins, C.M., Goei, S.W., Vukicevic, S., Nulend, J.K., Sampath, T.K., Helder, M., und Burger, E.H. (1994). Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. Journal of Bone and Mineral Research *9*, 771-80.

Domm, C., Fay, J., Schünke, M., und Kurz, B. (2000). Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur - Einfluss von intermittierendem hydrostatischen Druck und niedrigem Sauerstoffpartialdruck. Orthopädie *29*, 91-99.

Eckstein, F., Reiser, M., Englmeier, K.-H., und Putz, R. (2001). In vivo morphometry and functional analysis of human articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging - from image to data, from data to theory. Anatomy and Embryology *203*, 147-173.

Elima, K. und Vuorio, E. (1989). Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture. FEBS Letters *258*, 195-198.

Erggelet, C. und Steinwachs, M. (1998). Autologous chondrocyte transplantation: chondrocyte culturing and clinical aspects. In Biological matrices and tissue reconstruction. G.B. Stark, R. Horch, and E. Tánczos, eds. (Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Milan, Paris, Santa Clara, Singapore, Tokyo: Springer-Verlag), pp. 189-193.

Facchiano, A., De Marchis, F., Turchetti, E., Facchiano, F., Guglielmi, M., Denaro, A., Palumbo, R., Scoccianti, M., und Capogrossi, M.C. (2000). The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhinited by basic fibroblast growth factor. Journal of Cell Science *113*, 2855-2863.

Fertala, A., Sieron, A.L., Hojima, Y., Ganguly, A., und Prockop, D.J. (1994). Self-assembly into fibrils of collagen II by enzymic cleavage of recombinant procollagen II. Journal of Biological Chemistry *269*, 11584-11589.

Gardner, D.L. (1994). Problems and paradigms in joint pathology. *184*, 465-476.

Girotto, D., Urbani, S., Brun, P., Renier, D., Barbucci, R. und Abatangelo, G. (2003). Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. Biomaterials *24*, 3265-3275.

Guerne, P.-A., Blanco, F.J., Kaelin, A., und Desgeorges, A.L.M. (1995). Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. Arthritis and Rheumatism *38*, 960-968.

Guicheux, J., Palmer, G., Relic, B., Mezin, F., Caverzasio, J., Apostolides, P., Gauchat, J.-F., Gabay, C., und Guerne, P.-A. (2002). Primary human articular chondrocytes, dedifferentiated chondrocytes, and synoviocytes exhibit differential responsiveness to interleukin-4: correlation with the expression pattern of the common receptor gamma chain. Journal of Cellular

Physiology *192*, 93-101.

Guo, J., Jourdian, G.W., und McCallum, D.K. (1989). Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Connective Tissue Research

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

Hardingham, T.E. (1979). The role of link protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. Biochemical Journal *177*, 237-247.

Hardingham, T.E., Bayliss, M.T., Rayan, V., und Noble, D.P. (1992). Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. British Journal of Rheumatology *31 Suppl 1*, 1-6.

Harrison jr., E.T., Luyten, F.P., und Reddi, A.H. (1991). Osteogenin promotes reexpression of cartilage phenotype by dedifferentiated articular chondrocytes in serum-free medium. Experimental Cell Research *192*, 340-345.

Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., Deby, C., De Bruyn, M., Lamy, M., und Franchimont, P. (1993). Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. British Journal of Rheumatology *32*, 562-567.

Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J., und Holtzer, S. (1960). The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro: differentiation of cartilage cells. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America *46*, 1533-1542.

Horton jr., W.E., Higginbotham, J.D., und Chandrasekhar, S. (1989). Transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor act synergistically to inhibit collagen II synthesis through a mechanism involving regulatory DNA sequences. Journal of Cellular Physiology *141*, 8-15.

Häuselmann, H.J., Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L. , Kuettner, K.E., Gitelis, S.H., und Thonar, E.J.M.A. (1992). Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. Matrix *12*, 116-129.

Häuselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E., und Thonar, E.J.M.A. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. Journal of Cell Science *107*, 17-27.

Häuselmann, H.J., Masuda, K., Hunziker, E.B., Neidhard, M., Mok, S.S., Beat, M.A., und Thonar, E.J.M.A. (1996). Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. American Journal of Physiology *271*, C742-C752

Ingber, D.E. (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. Annual Review of Physiology *59*, 575-599.

Isomäki, P. und Punnonen, J. (1997). Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. Annals of Medicine *29*, 499-507.

Jakob, M., Demarteau, O., Schaefer, D., Hintermann, B., Dick, W., Heberer, M., und Martin, I. (2001). Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and catilaginous tissue formation in vitro. Journal of Cellular Biochemistry *81*, 368-377.

Jay, G.D., Britt, D.E., und Cha, C.J. (2000). Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression in human synovial fibroblasts. The Journal of Rheumatology *27* , 594-600.

Jones, K.L. und Addison, J. (1975). Pituitary fibroblast growth factor as a stimulator of growth in culture of rabbit articular chondrocytes. Endocrinology *97*, 359-365.

Kato, Y., Hiraki, Y., Inoue, H., Kinoshita, M., Yutani, Y., und Suzuki, F. (1983). Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. European Journal of Biochemistry *129*, 685-690.

Kim, A.C. und Spector, M. (2000). Distribution of chondrocytes containing α-smooth muscle actin in human articular cartilage. Journal of Orthopaedic Research *18*, 749-755.

Kimura, J.H., Hardingham, T.E., und Hascall, V.C. (1980). Assembly of newly synthesized proteoglycan and link protein into aggregates in cultures of chondrosarcoma chondrocytes. Journal of Biological Chemistry *255*, 7134-7143.

Kolettas, E., Buluwela, L., Bayliss, M.T., und Muir, H.I. (1995). Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. Journal of Cell Science *108*, 1991-1999.

Krakow, D., Sebald, E.T., Pogue, R., Rimoin, L.P., King, L. und Cohn, D.H. (2003). Analysis of clones from ahuman cartilage cDNA library provides insight into chondrocyte gene expression and identifies novel candidate genes for the osteochonrodysplasias. Molecular Genetics and Metabolism *79*, 34-42.

Kuettner, K.E., Memoli, V.A., Pauli, B.U., Wrobel, N.C., Thonar, E.J., und Daniel, J.C. (1982). Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype . Journal of Cellular Biology *93*, 751-757.

Kupchik, H.Z., Langer, R.S., Haberern, C., El Deriny, S., und O´Brien, M. (1983). A new method for the three-dimensional in vitro growth of human cancer cells. Experimental Cell Research *147*, 454-460.

Lafyatis, R., Thompson, N.L., Remmers, E.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kim, S.J., Case, J.P., Sporn, M.B., Roberts, A.B., und Wilder, R.L. (1989). Transforming growth factor-β production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. The Journal of Immunology *143*, 1142-1148.

Lai, W.M., Hou, J.S., und Mow, V.C. (1991). A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. Journal of Biomechanical Engineering *113*, 245-58.

Lapadula, G.F., Iannone, C., Zuccaro, V., Grattagliano, M., Covelli, V., Patella, G., Lobianco, G., und Pipitone, V. (1997). Integrin expression on chondrocytes: correlations with the degree of cartilage damage in human osteoarthrits. Clinical and Experimental Rheumatology *15*,

Lee, R.B. und Urban, J.P.G. (1997). Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. Biochemical Journal *321*, 95-102.

Loeser, R.F., Carlson, C.S., und McGee, M.P. (1995). Expression of $\beta 1$ integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. Experimental Cell Research *217*, 248-257.

Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Niederauer, G.G., und Boyan, B.D. (2000a). Der Differenzierungsgrad von Chondrozyten und ihre Vorbehandlung mit "platelet-derived-growth-factor" - Induktionsregulierung der Knorpelbildung in resorbierbaren Gewebeträgern in vivo. Orthopädie *29*, 120-128.

Lohmann, C.H., Schwartz, Z., Niederauer, G.G., Carnes jr., D.L., Dean, D.D., und Boyan, B.D. (2000b). Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. Biomaterials *21*, 49-61.

Luyten, F.P., Hascall, V.C., Nissley, S.P., Morales, T.I., und Reddi, A.H. (1988). Insulin-like gowth factors maintained steady state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. Archives of Biochemistry and Biophysics *267*, 416-425.

Maroudas, A. (1970). Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. Biophysical Journal *10*,

Maroudas, A., Palla, G., und Gilav, E. (1992). Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. Connective Tissue Research *28*, 161-9.

Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M., und Miller, E.J. (1976). Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America *73*, 1674-8.

Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Davies, L.W., Nuki, G., und Salter, D.M. (2000). Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthitic, human articular chondrocytes. Arthritis and Rheumatism *43*, 2091-2099.

Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Lee, H.-S., Nishida, K., Caldwell, H., und Salter, D.M. (1999). Integrin-regulated secretion of Interleukin 4: a novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. The Journal of Cell Biology *145*, 183-189.

Miossec, P., Chomarat, P., Dechanet, J., Moreau, J.F., Roux, J.P., Delmas, P., und Banchereau, J. (1994). Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an *ex vivo* model of bone resorption in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism *37*, 1715-1722.

Mok, S.S., Masuda, K., Häuselmann, H.J., Aydelotte, M.B., und Thonar, E.J.M.A. (1994). Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Journal of Biological Chemistry *269*, 33021-33027.

Morales, T.I. (1997). The role and content of endogenous insulin-like growth factor-binding proteins in bovine articular cartilage. Archives of Biochemistry and Biophysics *343* , 164-72.

Morales, T.I. und Roberts, A.B. (1988). Transforming growth factor-β regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. Journal of Biological Chemistry *263*, 12828-12831.

Muir, H.I. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. BioEssays *17*, 1039-1048.

Muldrew, K. (2002). Osteoarthritis as an inevitable consequence of the structure of articular cartilage. Medical hypotheses *59*, 389-397.

Nemoto, O., Yamada, H., Kikuchi, T., Shimmei, M., Obata, K.i., Sato, H., und Seiki, M. (1997). Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. The Journal of Rheumatology *24*, 1774-1779.

O´Driscoll, S.W., Fitzsimmons, J.S., und Commisso, C.N. (1997). Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. Journal of Orthopaedic Research *15*, 682-687.

Ochoa, E.R. und Vacanti, J.P. (2002). An overview of the pathology andapproaches to tissue engineering. Annals of the New York Academy of Science *979*, 10-26.

Osborn, K.D., Trippel, S.B., und Mankin, H.J. (1989). Growth factor stimulation of adult articular cartilage. Journal of Orthopaedic Research *7*, 35-42.

Outerbridge, H.K., Outerbridge, A.R., und Outerbridge, R.E. (1995). The use of lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. The Journal of Bone and Joint Surgery *77 A*, 65-72.

Patel, B.K., Wang, L.M., Lee, C.C., Taylor, W.G., Pierce, J.H., und LaRochelle, W.J. (1996). Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. J Biol Chem *271*, 22175-82.

Perka, C., Schultz, O., Sittinger, M. und Zippel, H. (2000). Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. Orthopädie *29*, 112-119.

Petit, B., Masuda, K., D´Souza, A.L., Otten, L., Pietryla, D., Hartmann, D.J., Morris, N.P., Uebelhart, D., Schmid, T.M., und Thonar, E.J.M.A. (1996). Characteriziation of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments . Experimental Cell Research *225*, 151-161.

Prins, A.P.A., Lipman, J.M., und Sokoloff, L. (1982). Effect of purified growth factors on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture - I. Dna synthesis. Arthritis and Rheumatism *25*, 1271-1227.

Qi, W.-N. und Scully, S.P. (1997). Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-beta 1. Journal of Orthopaedic Research *15*, 483-490.

Qi, W.-N. und Scully, S.P. (1998). Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. Experimental Cell Research *241*, 142-50.

Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R., und Dozin, B. (1997). Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium. Endocrinology *138*, 4966-4976.

Rathakrishnan, C. und Tiku, M.L. (1993). Lucigenindependent chemiluminescence in articular chondrocytes. Free Radical Biology and Medicine *15*, 143-149.

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

Rosado, E., Schwartz, Z., Sylvia, V.L., Dean, D.D., und Boyan, B.D. (2002). Transforming growth factor-β1 regulation of growth zone chondrocytes is mediated by multiple interacting pathways. Biochimica et Biophysica Acta *1590*, 1-15.

Rydziel, S. und Canalis, E. (1996). Expression and growth factor regulation of platelet-derived growth factor B transcripts in primary osteoblast cell cultures. Endocrinology *137*, 4115-4119.

Rydziel, S., Shaikh, S., und Canalis, E. (1994). Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhances the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. Endocrinology *134*, 2541-2546.

Sachs, B.L., Goldberg, V.M., Moskowitz, R.W., und Malemud, C.J. (1982). Response of articular chondrocytes to pituitary fibroblast growth factor (FGF). Journal of Cellular Physiology *112*, 51-59.

Sah, R.L., Kim, Y.J., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J., Plaas, A.H., und Sandy, J.D. (1989). Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. Journal of Orthopaedic Research *7*, 619-36.

Salmon, jr.W.D. und Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. Journal of Laboratory and Clinical Medicine *49*, 825-836.

Salter, D.M., Millward-Sadler, S.J., Nuki, G., und Wright, M.O. (2001). Integrin-Interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. Clinical Orthopaedics and Related Research *391*, S49-S60

Salter, D.M., Nuki, G., und Wright, M.O. (1996). IL-4 inhibition of cartilage breakdown in bovine articular explants. The Journal of Rheumatology *23*, 1314-1315.

Schalkwijk, J., Joosten, L.A.B., van den Berg, W.B., van Wyk, J.J., und van de Putte, L.B.A. (1989). Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. Arthritis and Rheumatism *32*, 66-71.

Schulze, M., Kuettner, K.E., und Cole, A.A. (2000). Adulte humane Chondrozyten in Alginatkultur - Beibehaltung des Phänotyps für die weitere Anwendung in Transplantationsmodellen. Orthopädie *29*, 100-106.

Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H.-J., Scheid, A., und Shakibaei, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. Cell Tissue Reserach *308*, 371-379.

Sekiya, I., Vuoristo, J.T., Larson, B.L. und Prockop, D.J. (2002). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 4397-4402.

Seko, Y., Tanaka, Y., und Tokoro, T. (1995). Influence of bFGF as a potent growth stimulator and TGF-ß as a growth regulator on scleral chondrocytes and scleral fibroblasts in vitro. Ophtalmic Research *27*, 144-152.

Shingu, M., Miyauchi, S., Nagai, Y., Yasutake, C., und Horie, K. (1995). The role of IL-4 and IL-6 in IL-1 dependent cartilage matrix degradation. British Journal of Rheumatology *34*, 101-106.

Shyy, J.Y.J. und Chien, S. (1997). Role of intgrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. Current Opinion in Cell Biology *9*, 707-713.

Sittinger, M., Reitzel, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, E., Planck, H., Burmester, G.R. und Bujia, J. (1996). Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials) *33*, 57-63.

Solursh, M. und Linsenmayer, T.F. (1982). Chondrogenesis from single limb mesenchyme cells. Developmental Biology *94*, 259-264.

Sporn, M.B. und Roberts, A.B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. Journal of Cell Biology *119*, 1017-21.

Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Singleton, S.B., und Briggs, K.K. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. Operative Tech Orthop *7*, 294-299.

Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., und Pledger, W.J. (1979). Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America *76*, 1279-1283.

Stokes, D.G., Liu, G., Coimbra, I.B., Piera-Velazquez, S., Crowl, R.M., und Jiménez, S.A. (2002). Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. Arthritis and Rheumatism *46*, 404-419.

Strehl, R., Schumacher, K., de Vries, U., und Minuth, W.W. (2002). Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. Tissue Engineering *8*, 37-42.

Tallheden, T., Dennis, J.E., Lennon, D.P., Sjogren-Jansson, E., Caplan, A.I. und Lindahl, A. (2003). Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. Journal of Bone and Joint Surgery of America, *85 A*, Suppl 2:93-100.

Tammi, M., Saamanen, A.M., Jauhiainen, A., Malminen, O., Kiviranta, I., und Helminen, H. (1983). Proteoglycan alterations in rabbit knee articular cartilage following physical exercise and immobilization. Connect Tissue Res *11*, 45-55.

Tatsuya, H., Fujioka, M., Otsuka, G., Inoue, S., Kim, U. und Kubo, T. (2003). Effect of heat stimulation on viability and proteoglycan metabolism of cultured chondrocytes: preliminary report. Journal of Orthopaedic Science *8*, 396-399.

Treilleux, I., Mallein-Gerin, F., Guellec, D., und Herbage, D. (1992). Localisation of the expression of

type I, II, III collagen and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage. Matrix *12*, 221-232.

Trippel, S.B. (1995). Growth factor actions on articular cartilage. The Journal of Rheumatology *22*, 129-132.

Tschan, T., Hoerler, I., Houze, Y., Winterhalter, K.H., Richter, C., und Bruckner, P. (1990). Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. Journal of Cell Biology *111*, 257-260.

Urban, J.P.G. (1994). The chondrocyte: a cell under pressure. British Journal of Rheumatology *33*, 901-8.

Valhmu, W.B., Stazzone, E.J., Bachrach, N.M., Saed-Nejad, F., Fischer, S.G., Mow, V.C., und Ratcliffe, A. (1998). Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. Archives of Biochemistry and Biophysics *353*, 29-36.

van der Kraan, P.M., Vitters, E.L., und van den Berg, W.B. (1992). Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor-β in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. Annals of the Rheumatic Diseases *52*, 634-647.

Venn, M. und Maroudas, A. (1977). Chemical composition and swelling of normal and osteoarthritic femoral head cartilage. 1. Chemical composition. Annals of the Rheumatic Diseases *36*, 121-129.

Villiger, P.M. und Lotz, M. (1992). Differential expression of TGFβ isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. Journal of Cellular Physiology *151*, 318-325.

Vivien, D., Boumedienne, K., Galera, P., Lebrun, E., und Pujol, J.-P. (1992). Flow cytometric detection of transforming growth factor-β expression in rabbit articular chondrocytes in culture association with S-phase traverse. Experimental Cell Research *203*, 56-61.

Vivien, D., Galera, P., Lebrun, E., Loyau, G., und Pujol, J.-P. (1990). Differential effects of trasforming growth factor-β and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. Journal of Cell Biology *143*, 534-545.

Vivien, D., Redini, F., Galéra, P., Lebrun, E., Loyau, G., und Pujol, J.-P. (1993). Rabbit articular chondrocytes (RAC) express distinct transforming growth factor-β receptor phenotypes as a function of cell cycle phases. Experimental Cell Research *205*, 165-170.

von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., und Mueller, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature *267*, 531-2.

Wang, Q., Breinan, H.A., Hsu, H.P., und Spector, M. (2000). Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular alpha-smooth muscle actin-containing cells. Wound Repair and Regeneration *8*,

Wang, W., Chen, H.J., Yazdani, S., Simon, A., Schwartz, A., und Rabbani, L.E. (1998). Interleukin-4 Modulation of Platelet-Derived Growth Factor-Induced Smooth Muscle Cell Urokinase Plasminogen Activator. J Thromb Thrombolysis *5*, 119-123.

Watanabe, H., Kimata, K., Line, S., Strong, D., Gao, L.Y., Kozak, C.A., und Yamada, Y. (1994). Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. Nature Genetics *7*, 154-7.

Watanabe, K., Tanaka, Y., Morimoto, I., Yahata, K., Zeki, K., Fujihira, T., Yamashita, U., und Eto, S. (1990). Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. Biochemical and Biophysical Research Communications *172*, 1035-1041.

Watt, F.M. (1988). Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. Journal of Cell Science *89*, 373-378.

Wells, T., Davidson, C., Mörgelin, M., Bird, J.L.E., Bayliss, M.T. und Dudhia, J. (2003). Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. Biochemical Journal *370*, 69-79.

Wilson, E., Mai, Q., Sudhir, K.W.R.H., und Ives, H.E. (1993). Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. Journal of Cell Biology *123*, 741-747.

Woessner, J.F.Jr (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB Journal *5*, 2145-2154.

Wolfe, S. L. (1993). Molecular and cellular biology (Belmont, Wadsworth Publishing Company).

Wright, M. O., Nishida, K., Bavington, C., Godolphin, J. L., Dunne, E., Walmsley, S., Jobanputra, P., Nuki, G., und Salter, Donald M (1997). Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for α5β1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. Journal of Orthopaedic Research *15*:742-747.

Wu, J.-J., Woods, P.E., und Eyre, D.R. (1992). Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an anti-parallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type II bonding. Journal of Biological Chemistry *267*, 23007-23014.

Yaeger, P.C., Masi, T.L., Buck de Ortis, J.L., Binette, F., Tubo, R., und McPherson, J.M. (1997). Synergistic action of transforming growth factor-β and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. Experimental Cell Research *237*, 318-325.

Yeh, L.-A., Augustine, A.J., Lee, P., Riviere, L.R., und Sheldon, A. (1995). Interleukin-4, an inhibitor of cartilage breakdown in bovine articular cartilage explants. The Journal of Rheumatology *22*, 1740-1746.

Zaleskas, J.M., Kinner, B., Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., und Spector, M. (2001). Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. Experimental Cell Research *270*, 21-31.

Zhu, W., Lai, W.M., und Mow, V.C. (1991). The density and strength of proteoglycan-proteoglycan interaction sites in concentrated solutions. Journal of Biomechanics *24*, 1007-18.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

a. dest.	destilliertes Wasser
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische Phosphatase – anti-alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AsAP/C	Ascorbinsäure-2-Phosphat + Cystein
bFGF, FGF, F	*basic fibroblast growth factor*
BMP	*bone morphogenetic protein*
$CaCl_2$	Calciumchlorid
D.F	Freiheitsgrade (*degrees of freedom*)
DMEM	*Dulbecco´s modified eagle medium*
DMMB	1,9-Dimethyl-Methlenblau-Chlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	*Epidermal growth factor*
FKS	fötales Kälberserum
G/D-Verhältnis, G/D-Relation	GAG zu DNA - Verhältnis
GAG	Glykosaminoglykane
hCh	humane Chondrozytenlinie
HCl	Salzsäure
HD-Kultur	high-density Kultur
HEPES	2-[4-(2-Hydoxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HS	Humanserum
IGF-I, IGF, I	*insulin-like growth-factor I*
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
JAA	Jodacetamid
K	Kontrolle
K I	Kollagen Typ I
K II	Kollagen Typ II
MACT	Matrixassoziierte autologe Chondrozyten Transplantation
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
n	Probenanzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
O_2	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau

P x	Passage Nummer
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCM	Perizelluläre Matrix
PDGF-BB, PDGF, P	*platelet derived growth factor-BB*
PG	Proteoglykane
PGA	*poly-glycolic acid*
PLA	*poly-lactic acid*
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
p_{O2}	Sauerstoffpartialdruck
R^2	Regressionskoeffizient
ROS	*reactive oxygen species*
RT	Raumtemperatur
SMA	*smooth muscle actin*
TBS	*Tris buffered saline*
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-$\beta_{1,}$ TGF, T	*transforming growth factor* β_1
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinases*
TNF-α	*tumor necrosis factor a*
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKE	Universitäts Klinikum Eppendorf

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten

Frank Feyerabend
geboren am 7.10.1971 in Wuppertal

Ausbildung

Januar 1991	Abitur
Oktober 1991	Beginn des Biologiestudiums in Marburg a. d. L.
Oktober 1991 bis Juli 1993	Grundstudium Biologie in Marburg
Oktober 1993	Vordiplom im Fach Biologie; Zeugnis vom 4.11.1993, Gesamtnote „gut“
Oktober 1993 bis Februar 1997	Hauptstudium • Hauptfach: Zoologie • 1. Nebenfach: Mikrobiologie • 2. NF: Biochemie • 3. NF: Genetik
April 1997	Diplomprüfung in den Fächern Zoologie, Mikrobiologie, Biochemie und Genetik
April 1997 bis Mai 1998	Diplomarbeit im Hauptfach Zoologie: „Ökologische Untersuchungen verschiedener Aspekte der sommerlichen Aktivität der Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*)“

13.Juli1998	Zeugnis der Diplom-Hauptprüfung, Gesamtnote „sehr gut“
Juni 1998 bis Dezember 1998	Mitarbeit im E+E-Projekt; „Schaffung eines Quartierverbunds für gebäudebewohnende Fledermausarten“ in Marburg. Aufgaben u.a.: • Erstellung einer Datenbank • Auswertung und grafische Darstellung von Daten • Hilfe bei methodischen und statistischen Problemen • Öffentlichkeitsarbeit (Diavorträge u.a.) • Mitbetreuung von Seminaren Gutachtertätigkeit (UVP)
1. Januar 1999	Wechsel an die Universität Hamburg, Zoologisches Institut und Museum (ZIM), Beginn der Arbeit an der Promotion „Ethoökologie von Fledermäusen und Fledermausschutz in Hamburg“ in der AG Ökologie und Naturschutz bei Prof. Dr. J. Ganzhorn.
1. Januar 2000	Wechsel der Arbeitsgruppe zu PD Dr. P. Adamietz, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie. Neues Promotionsthema: „Tissue engineering von Knorpel im Schweinemodell und im humanen System“
Seit 1.1.2003	Post-Doc-Stelle beim GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH. Thema: „ Modifikation metallischer Implantatoberflächen mit künstlichen Zellmembranen“
Ehrenamt	Fachschaftsarbeit von 1992 bis 1997, Fachschaftsrat 1993-97; Mitglied des Fachbereichsrates als studentischer Vertreter 1994-96, Mitglied im Diplomprüfungsausschuß 1996/97; Mitglied im Fachbereichsausschuß „Organisation und Forschung“ 1995-97; studentischer Vertreter in 4 Habilitationskommissionen; studentischer Vertreter in 4 Berufungskommissionen