Klinik für Orthopädie am RKU, Universitätsklinikum Ulm

Prof. Dr. med. Heiko Reichel
Ärztlicher Direktor

Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankung

Prof. Dr. med. Rolf Brenner
Leiter

Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen chondrogenen Progenitorzellen in einer dezellularisierten Matrix aus Schweineknorpel

---

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Esther Johanna Schäfer

geboren in Berlin

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Brenner
2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. Rotter

Tag der Promotion: 04.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Traumabedingte Knorpeldefekte als Krankheitsbild und deren pathogenetische Bedeutung 1

1.2 Knorpelgewebe 2

1.3 Angewandte Technologien zur Behandlung von Knorpeldefekten und deren Limitationen 5

1.4 Gewebeständige Progenitorzellen als vielversprechende Subpopulation mit Regenerationspotential 7

1.5 Der Einsatz von Matrizes in der Knorpelregeneration 10

1.6 Ziel: Therapeutische Rekonstruktion von Knorpeldefekten 13

2 Material und Methoden 15

2.1 Material 15

2.2 Verwendete Chemikalien und Kits 25

2.3 Primer 30

2.4 Antikörper 31

2.5 Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien, Wachstumsfaktor 32

2.6 Computerprogramme 34

2.7 Methoden 34

2.8 Statistik 47

3 Resultate 48

3.1 Expression von Matrixkomponenten in besiedelten pNSC-Scaffolds 48

3.2 Zellschichtbildung und Migrationsaktivität der CPC in pNSC-Scaffolds 74

4 Diskussion 77

4.1 Voraussetzungen und Beurteilung des Modells 77

4.2 Beurteilung der Zellschichtbildung und Migration der Zellen in den pNSC-Scaffolds 78

4.3 Matrixsynthese - ACAN (Aggrekan), Kollagene Typ I, II, X werden medien- und versuchsabhängig unterschiedlich stark exprimiert und gebildet 86
4.4 Eignung von CPC und pNSC für die Rekonstruktion von Knorpeldefekten im Gelenkbereich – ein Ausblick 95
5 Zusammenfassung 100
6 Literaturverzeichnis 102
Danksagung 115
Lebenslauf 116

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	(complementary)Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
(m),(r)RNA	(messenger), (ribosomale) Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ACAN	Aggrekan (Aggrecan)
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AMIC	autologous matrix-induced chondrogenesis
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM	Basalmedium

BMP-6	Bone morphogenetic protein-6
bp	Basenpaar(e) (base pair(s))
BSA	Bovines Serumalbumin
CDM	chondrogenes Differenzierungsmedium
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
COL10A1	Kollagen Typ X, alpha 1
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha 1
COL2A1	Kollagen Typ II, alpha 1
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
(ns)CPC	(nasale) chondrogene Progenitorzelle/n
Ct-Wert	cycle threshold
d	Durchmesser
DCM-/DCBM-Scaffold	Decellularized cartilage matrix-/Decellularized cancellous bone matrix-Scaffold
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DP	Dezellularisierungs-/Sterilisierungsprozess
EZM	Extrazellulär-Matrix
FAM	6-Carboxyfluorescein

Fe-Chlorid ($FeCl3*H_2O$)	Eisenchlorid
Fe-Sulfat ($FeSO_4x7H_2O$)	Eisensulfat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
hCh	humane Chondrozyten
HAV/HBV/HCV	Hepatitis-A/-B-/-C-Virus
hPCh	human primary nasal chondrocytes
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IL-1β/-6	Interleukin-1β/-6
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITS	Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement
Knie-TEP	Totale Endoprothese des Kniegelenks
l	Liter
log_{10}	dekadischer Logarithmus
M	Molar

m	Meter
MACI	MACI Matrix-induzierte Chondrozyten-Implantation
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$mm^{(2)}$	(Quadrat-)Millimeter
MMP-9	Matrix-Metallo-Proteinase-9
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MSC	Mesenchymale Stammzelle/n (Mesenchymal stem cell/s)
n	Anzahl
Na_2EDTA	Natriumethylendiamintetraessigsäure
ng	Nanogramm
NH	Nichthämatogenes Differenzierungsmedium
OCT	Osteochondrale Transplantation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHBV/PAM-Scaffolds	Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat) (PHBV)/Polyacrylamid (PAM)-Scaffolds

pNSC	Knorpel aus Schweinenasensepten (porcine nasal septal cartilage)
PTA	Posttraumatische Arthrose
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RQ	Relative Quantifizierung
RSV	Respiratorische Synzytial-Viren
RUNX-2	Runt-related transcription factor 2
SD	Standardabweichung (standard deviance)
SEM	Standardfehler bzw. Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-Propyl)- Propylamino]-1-Phenyl- 1H-Chinolin-4-Ylidenmethyl}- 3-Methyl-Benzothiazol-3-ium-Kation
T_0	Zeitpunkt 0
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF(-β3)	Transforming growth factor (-β3)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U	Einheiten (Units)
W	Wochen

1 Einleitung

1.1 Traumabedingte Knorpeldefekte als Krankheitsbild und deren pathogenetische Bedeutung

Knorpeldefekte stellen im Allgemeinen ein bedeutendes Problem dar, da Knorpelgewebe eine schlechte Regenerationsfähigkeit aufweist (Buckwalter & Mankin 1998, Horton et al. 2006, Martin & Buckwalter 2001, Roos 2005) und es bislang kein klinisches Therapiekonzept gibt, das den ursprünglichen physiologischen Zustand geschädigten Knorpelgewebes wiederherstellen kann. Häufig sind fokale Knorpeldefekte bedingt durch starke physische Belastungen des Gelenks, welche akut, v. a. traumatisch, oder chronisch über einen längeren Zeitraum hinweg verursacht sein können (Cucchiarini et al. 2014). Es ist bekannt, dass Gelenksverletzungen im Allgemeinen häufig bei jungen und aktiven Menschen vorkommen (Dirschl et al. 2004, Furman et al. 2006). Das Risiko hierbei eine sekundäre bzw. posttraumatische Arthrose (PTA) zu entwickeln, bewegt sich zwischen 20-50 % (Dirschl et al. 2004). Man geht davon aus, dass die Arthrose bis zum Jahr 2020 der vierthäufigste Grund für Invalidität sein wird (Woolf & Pfleger 2003), sodass die soziale Belastung durch die Arthrose wohl neben dem Altern und Übergewicht ansteigen wird (Felson 2006). Relevanz erhält diese Thematik u. a. auch aus ökonomischen Gründen, da die sekundäre Arthrose als Folge eines Knorpeldefekts einen wichtigen Grund für die Arbeitsunfähigkeit nach Traumata der Gelenke der unteren Extremität darstellt (Swiontkowski & Chapman 1995). Bei der Einteilung der Knorpeldefekte werden chondrale von osteochondralen Läsionen unterschieden. Bei Ersteren wird wiederum zwischen rein chondralem und komplettem Knorpelschichtdefekt unterschieden, der bis auf den subchondralen Knochen reicht, dessen Grenze jedoch nicht überschreitet. Osteochondrale Läsionen hingegen reichen profunder bis über die Grenze des subchondralen Knochens hinaus (Cucchiarini et al. 2014).

Die eingeschränkte Heilungsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels, einen entstandenen Defekt adäquat mit gesundem Knorpelgewebe zu ersetzen, liegt einerseits in der geringen Zelldichte der Zellen innerhalb des Knorpels begründet, andererseits ist auch denkbar, dass die Extrazellulärmatrix (EZM) des

Knorpelgewebes durch ihre Dichte die Migration der Chondrozyten zum Ort der Verletzung verhindert (Brenner & Fiedler 2008, Morales 2007). Desweiteren stellt die o.g. fehlende Blutversorgung des Knorpels ein zusätzliches Hindernis dar (Brenner & Fiedler 2008, Morales 2007), die eine suffiziente Knorpel-Regeneration verhindert. Zusätzlich tragen die Degeneration des Gelenkknorpels und Chondrozyten-Seneszenz nach Knorpeltrauma oder außerordentlicher Belastung zur Pathogenese bei (Buckwalter & Mankin 1998, Horton et al. 2006, Martin & Buckwalter 2001, Roos 2005), sodass häufig eine therapeutische Intervention auf kurze oder lange Sicht notwendig wird.

1.2 Knorpelgewebe

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Knorpel: Den hyalinen Knorpel, der im menschlichen Körper am häufigsten vorkommt, den elastischen Knorpel und den Faserknorpel (Lüllmann-Rauch 2006). Abgesehen vom Primordialskelett ist der Knorpel ein gefäßfreies Gewebe, sodass die Versorgung der in ihm befindlichen Chondrozyten über die Diffusion erfolgen muss (Lüllmann-Rauch, 2006). Außerdem sind im Knorpel keine Lymphgefäße oder Nerven vorhanden (Hartmann et al. 2010). Hauptbestandteile des Knorpelgewebes sind EZM und Chondrozyten (Niethard et al. 2014, Lüllmann-Rauch 2006), deren Aufgabe die Synthese der EZM darstellt (Lüllmann-Rauch 2006), sodass sie als einzig vitaler Bestandteil des Knorpels die Grundsubstanz des Knorpelgewebes, nämlich Kollagene und Proteoglykane produzieren (Niethard et al. 2014). Hyaliner Gelenkknorpel setzt sich zu 70 % aus Wasser, 15 % aus Kollagen, 12 % aus Proteoglykanen (Seitz et al. 2014) und ca. 1-10 % aus Chondrozyten zusammen (Martel-Pelletier et al. 2008), sodass er verglichen mit anderen Geweben ein zellarmes, viskoelastisches Bindegewebe darstellt (Martel-Pelletier et al. 2008, Kuettner 1992). An erster Stelle des Kollagennetzwerks steht Kollagen Typ II, das dessen größten Anteil darstellt und mit Kollagen Typ IX und XI Heterofibrillen bildet (Martel-Pelletier et al. 2008). Kollagen Typ X wird von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert (Girkontaite et al. 1996, Kirsch & von der Mark 1991) und umgibt diese (Martel-Pelletier et al. 2008). Normalerweise wird es nur in

geringer Quantität im gesunden adulten Gelenkknorpel in der Tidemark, i.e. dem Übergang zum subchondralen Knochen, vereinzelt auch in den angrenzenden Knochenbälkchen, gefunden (Hoyland et al. 1991). Dagegen bildet Kollagen Typ X im arthrotischen Gelenk einen stetig bedeutsameren Bestandteil in der Grenzschicht zwischen Knorpel und Knochen, v. a. in Bereichen von Zellclustern mit Zeichen der Zellhypertrophie (Gannon et al. 1991, Girkontaite et al. 1996). Von diversen Autoren wird ihm ein pathogenetischer Stellenwert an der Arthrose zugeschrieben (Hoyland et al. 1991, von der Mark et al. 1992).

Chondrozyten zeigen insgesamt nur eine geringe metabolische Aktivität, was das Knorpelgewebe als sog. bradytrophes Gewebe auszeichnet (Lüllmann-Rauch 2006). Ihre Entwicklung wird durch Enzyme, Hormone und Metabolite gesteuert, wobei sie nur während des Wachstumsalters mitotisch aktiv sind und hierdurch für die Heilung von Wunden innerhalb des Knorpels sowie das Wachstum eine Rolle spielen. Beim Erwachsenen hingegen ist die Teilungsfähigkeit der Chondrozyten bereits verloren gegangen (Niethard et al. 2014).

Wichtige Eigenschaften des Knorpels sind zum einen dessen Festigkeit, die durch die unter Zug stehenden Kollagenfibrillen in Kombination mit den unter hohem Expansionsdruck stehenden Proteoglykanen bedingt wird. Zum anderen zeichnet er sich durch seine Verformbarkeit aus, sobald ihm eine Druckbelastung zugeführt wird sowie die Fähigkeit, wieder seine ursprüngliche Form zurückzuerlangen, sobald die Belastung beendet ist. Er fungiert als Stoßdämpfer für den unter ihm befindlichen Knochen, indem der Knorpel für eine gleichmäßige Spannungsverteilung auf druckbelasteten Stellen sorgt (Lüllmann-Rauch 2006).

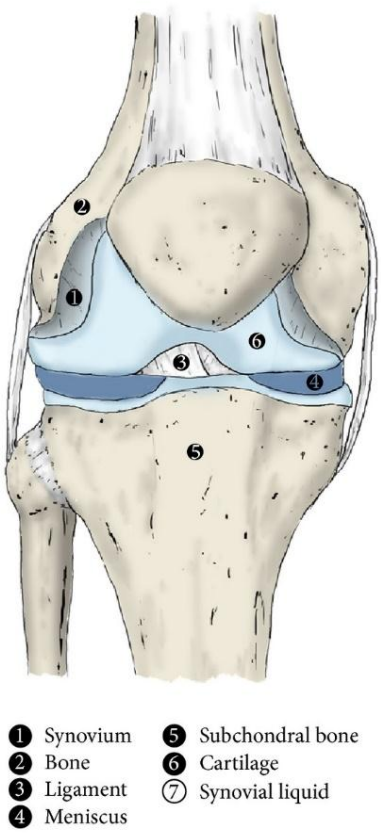


Abbildung 1: ***Anatomie eines Kniegelenks, u. a. aus einer hyalinen Gelenkoberfläche, einem Gelenkspalt und der Gelenkkapsel bestehend (Sánchez et al. 2014, S. 2). Copyright © 2014 Sánchez et al., erschienen unter der Lizenz Creative Commons BY 3.0 https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/.***

Proteoglykane, vorherrschend Aggrekan (Martel-Pelletier et al. 2008), sind in großer Menge in der EZM des Knorpels in einem fibrillären Netzwerk aus Kollagenen enthalten (Kuettner 1992). Im Zentrum tragen sie ein Kernprotein, das zahlreiche Seitenketten aus Chondroitin- und Keratansulfat enthält, die wiederum jeweils aus vielen Disaccharideinheiten aufgebaut sind. Die Kernproteine des Aggrekans sind über Verbindungsproteine nicht-kovalent an Hyaluronsäure gebunden (Lüllmann-Rauch 2006). Dadurch können sie noch höhermolekulare Aggregate bilden (Schünke 2014).

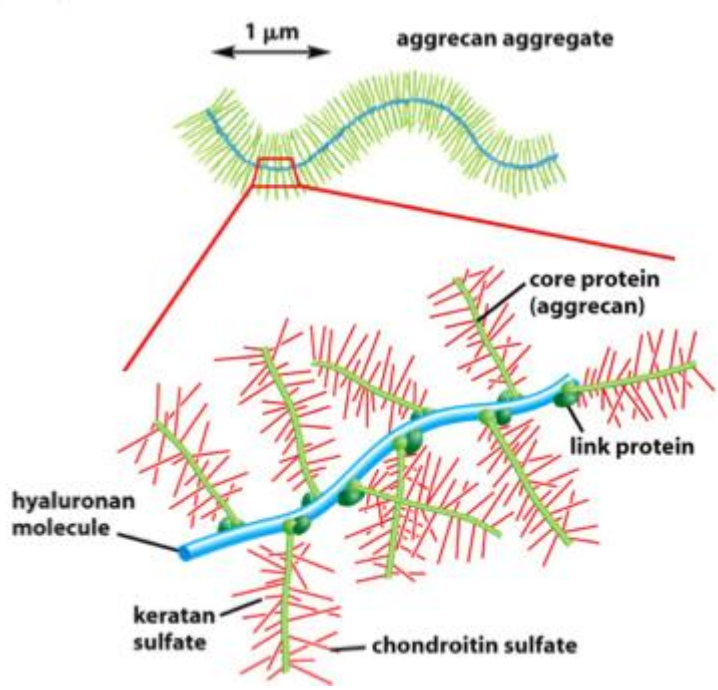


Abbildung 2: ***Schematische Darstellung eines Konglomerats aus Aggrekan-Molekülen und Hyaluronsäure, verbunden über Link-Proteine (Alberts et al. 2008, S. 1182).***
Copyright © 2008 aus Molecular Biology of the Cell, 5. Auflage von Alberts et al. (Autoren)/Anderson M, Granum S (Hrsg.). Mit freundlicher Genehmigung von Taylor and Francis Group, LLC, a division of Informa plc.

1.3 Angewandte Technologien zur Behandlung von Knorpeldefekten und deren Limitationen

Zur Förderung der Knorpelheilung sind bereits zahlreiche unterschiedliche Therapien untersucht worden, wie z. B. Transplantationen von Gewebe und Zellen (Benders et al. 2013, Wakitani et al. 2002). Diese beruhen auf verschiedenen Herangehensweisen: Das beschädigte bzw. verlorene Knorpelgewebe im Gelenk kann entweder mittels Zelltherapien behandelt werden, wie die Autologe Chondrozyten-Implantation (ACI) und die Matrix-assistierte Chondrozyten-Implantation (MACI) (Benders et al. 2013, Ochi et al. 2002, Wasiak et al. 2006), andererseits wird die Mosaikplastik angewandt, bei der eine größere Anzahl an kleinen, autologen osteochondralen Transplantaten (OCT) verwendet wird oder durch ein osteochondrales allogenes Transplantat ersetzt werden (Benders et al. 2013, Wakitani et al. 2002, Wasiak et al. 2006). Weitere Eingriffe stellen Knochenmarks-Stimulationstechniken dar, wie die Anbohrung und die

Microfracture-Technik (Steadman et al. 2001, Wasiak et al. 2006, Benders et al. 2013, Matsunaga et al. 2007, Kaul et al. 2012), durch die eine Einwanderung von mesenchymalen Vorläuferzellen (MSC) aus dem Knochenmark in den Knorpeldefekt ermöglicht wird, die dort chondrogen differenzieren und eine hyaline Knorpelmatrix bilden sollen. MSC sind multipotente, aus dem Knochenmark stammende Zellen mit proliferativem Phäntotyp, die sich in verschiedene mesenchymale Richtungen differenzieren können, deren Zellen schließlich Knorpel, Knochen, Sehnen, Fett und weiteres Bindegewebe erzeugen (Gao & Caplan 2003). Letztendlich aber treiben sie die Bildung fibrösen Knorpelgewebes voran (Simon & Jackson 2006). Desweiteren stellt die *autologous matrix-induced chondrogenesis* (AMIC) eine Methode zur Behandlung von Knorpeldefekten dar. Hierbei handelt es sich um eine vom Schwein stammende Kollagen-Typ-I/III-Matrix, die nach Anbohrung der betroffenen Knorpel-/Knochenschicht in diesem Bereich eingebracht wird und hierdurch entstandene Blutgerinnsel mit darin enthaltenen MSC bedeckt, welche sich nachfolgend in Chondrozyten differenzieren (Benthien & Behrens 2010, Gille et al. 2010). Die Auswahl der therapeutischen Verfahren wird auf Basis der Knorpeldefektgröße ausgewählt: Beim symptomatischen Knorpelschaden werden prinzipiell Knochenmarks-Stimulationstechniken, die ACI oder AMIC angewandt. Bei einer Defektgröße > 3-4 cm² wird hierbei primär die ACI durchgeführt. Ist der Defekt ≤ 3-4 cm² wird nochmals unterteilt in Defekte < 1,5 cm², die durch AMIC behandelt werden können (Benthien & Behrens 2011), ≤ 2,5 cm², bei denen die Knochenstimulationstechniken zum Einsatz kommen, und > 2,5 cm², bei denen man sich in erster Linie für eine ACI entscheidet. Bei osteochondralen Defekten wird zwischen der ACI bei großen und der OCT bei kleinen Durchmessern gewählt (Niemeyer et al. 2013). Ist ein osteochondraler Defekt < 1,5 cm² kann wiederum die AMIC zum Einsatz kommen (Benthien & Behrens 2011). Die Langzeitprognose der oben genannten Interventionen ist bis heute insgesamt verbesserungswürdig. Die Behandlungstechniken haben regelmäßig ein nachteiliges und fehlerhaftes, weiches, spongiöses faserknorpeliges Reparationsgewebe mit zentraler Degeneration zum Ergebnis (Wasiak et al. 2006, Peterson et al. 2000, Kock et al. 2012, Gille et al. 2013, Matsunaga et al. 2007, Goyal et al. 2013, Müller & Kohn

1999). Bei der Mosaikplastik zeigt sich nachfolgend bspw. oft eine unzureichende laterale Einbettung des Transplantats (Hangody et al. 2004). Eine weitere Problematik stellen bei autologen Methoden iatrogen verursachte zusätzliche Knorpeldefekte an den Entnahmestellen dar (Wakitani et al. 2002, Wasiak et al. 2006). Bei der ACI gibt es keine einheitlichen Ergebnisse, was die Bildung hyalinen Knorpelgewebes in Knorpeldefekten betrifft (Brittberg et al. 1994, Minas 1998, Peterson et al. 2000 und 2010). Bei den Knochenmarks-Stimulationstechniken bildet sich häufig Faserknorpel (Steinert et al. 2007). Hierdurch bleibt die Heilung großer, die ganze Schicht betreffende Knorpel- und osteochondraler Verletzungen immer noch eine wichtige Herausforderung (Wakitani et al. 2002). Zur Überwindung dieser Probleme und zur Optimierung der Regeneration funktionellen Knorpelgewebes hat sich die Anwendung abbaubarer natürlicher und synthetischer Biomaterialien in Kombination mit bioaktiven Molekülen und Chondrozyten als vielversprechende Grundlage für neue regenerative Therapien ergeben (Bartlett et al. 2005, Nooeaid et al. 2012, Benders et al. 2013, Tuli et al. 2003, Tuan et al. 2003). Trotz der großen Fortschritte im Bereich der Materialwissenschaften bleibt immer noch der Bedarf an Biomaterialien mit entsprechenden biomechanischen und biologischen Eigenschaften für eine zufriedenstellende Gewebe-Integration und -Ausdifferenzierung (Benders et al. 2013).

1.4 Gewebeständige Progenitorzellen als vielversprechende Subpopulation mit Regenerationspotential

Außer im Knochenmark und in Knochentrabekeln (Nöth et al. 2002) sind Vorläuferzellen aus Knorpelgewebe in der Synovialmembran (De Bari et al. 2001), -flüssigkeit (Jones et al. 2008, Sekiya et al. 2012), im infrapatellaren Fettkörper (Wickham et al. 2003) und im Gelenkknorpel selbst (Alsalameh et al. 2004, Fickert et al. 2004, Hiraoka et al. 2006) identifiziert worden, die laut der *international society for cellular therapy* (ISCT) zwar nicht identisch, aber humanen MSC sehr ähnlich sind (Dominici et al. 2006). Sie besitzen mehrere, auch auf MSC vorhandene Oberflächenmarker, unter anderem die Kombination CD9+, CD90+

und CD166+, und weisen ein multipotentes Differenzierungspotential auf, was auf einen Progenitor-assoziierten Phänotyp dieser knorpelstämmigen Zellen hinweist (Fickert et al. 2004). Joos et al. konnten kürzlich zeigen, dass makroskopisch intakter arthrotischer Knorpel chondrogene Progenitorzellen (CPC) enthält (Joos et al. 2013), die auch aus Lücken der Tidemark stammen könnten (Koelling et al. 2009), aber eher knorpelgewebsständige Zellen sind (Joos et al. 2013). Sie exprimieren für MSC typische Oberflächenmarker, unter anderem Adhäsionsrezeptoren, wie z. B. Integrine (Joos et al. 2013) und zeigen *in vitro* migratorische Aktivität, die durch Serum, *transforming growth factor- β3* (TGF-β3) oder durch traumainduzierte Faktoren aus dem Knorpelgewebe verstärkt wird (Joos et al. 2013, Koelling et al. 2009). CPC sind dabei dazu in der Lage, aktiv aus Knorpelgewebestücken auszuwachsen (Joos et al. 2013). Sie exprimieren verglichen mit Chondrozyten möglicherweise vermehrt Gene wie MMPs, die somit die Migration beeinflussen, wie Seol et al. und Koelling et al. feststellten (Seol et al. 2012, Koelling et al. 2009). Koelling et al. konnten zudem zeigen, dass diese Zellpopulation *ex vivo* Gewebe einer fortgeschrittenen Arthrose besiedelte und tief innerhalb des erkrankten Gewebes proliferierte (Koelling et al. 2009). Joos et al. und weitere Arbeitsgruppen zeigten, dass CPC ein multipotentes Differenzierungspotential besitzen, indem sie sich adipogen, osteogen und chondrogen differenzierten (Joos et al. 2013, Koelling et al. 2009). Dies stellt das wichtigste charakteristische Merkmal von mesenchymalen Stammzellen dar (Koelling et al. 2009). Koelling et al. bewiesen, dass CPC sich insbesondere in einer 3D-Matrix *in vitro* chondrogen differenzieren (Koelling et al. 2009). Hierbei spielen Wachstumsfaktoren mit deren autokrinen, i.e. auf die Zielzelle selbst, und parakrinen, i.e. auf benachbarte Zellen, Wirkung durch Auslösung verschiedener Signalkaskaden und Prozesse wie Zellproliferation, Matrixsynthese, Zellmigration und Differenzierung eine besondere Rolle (Rose & Oreffo 2002). Dabei steuert der *transforming growth factor* (TGF) vorwiegend anabole Prozesse im Knorpel, wie Gewebeproliferation/-differenzierung und Wachstum. Darüber hinaus fördert TGF-β3 eine vermehrte chondrogene Differenzierung durch Stimulation der Kollagensynthese von MSC (Gupta et al. 2011). Mit dem Zusatz chondrogener Mediatoren wie bspw. TGF-β3 und *bone morphogenetic protein-6* (BMP-6),

welche in CPC *in vitro* eine chemotaktische Wirkung erzielen, exprimierten CPC eine erhöhte Menge an Kollagen Typ II-Protein bzw. zeigten eine vermehrte Faserbildung (Koelling et al. 2009). Als Folge von der Zugabe von chondrogenen Mediatoren zeigen CPC also eine chondrogene Differenzierung (Joos et al. 2013). Allerdings ist noch unklar, weshalb die Zell-Rekrutierung *in vivo* niedrig erscheint (Milentijevic et al. 2005). Der Einsatz von Chondrozyten und MSC im Rahmen der degenerativen Gelenkerkrankung weist Limitationen auf, wie das zweizeitige Vorgehen mit notwendiger Chondrozyten-Entnahme zur *In-vitro*-Zellvermehrung (Benders et al. 2013, Ochi et al. 2002, Wasiak et al. 2006) mit begrenztem Regenerationspotential (Chondrozyten) bzw. die Nicht-Migration in den Knorpel selbst (MSC) (Buckwalter & Mankin 1998, Horton et al. 2006, Martin & Buckwalter 2001, Roos 2005, Murphy et al. 2003). Im Gegensatz hierzu unterstützen CPC mit ihrer hohen chondrogenen Differenzierungskapazität (Koelling et al. 2009) sowie der Möglichkeit der lokalen Rekrutierung Ansätze der endogenen regenerativen Heilung verletzten Knorpels *in situ* (Joos et al. 2013), sodass CPC im Bereich der *In-situ*-Regeneration evtl. eine Quelle neuer Hoffnung darstellen.

Es bleibt insgesamt ein entscheidender Faktor, die optimalen Bedingungen herauszufinden, unter denen die CPC ihre chondrogenen Fähigkeiten präsentieren (Koelling et al. 2009). Dies wirft gleichzeitig die Frage auf, welche Eigenschaften die EZM haben muss, damit ausreichend Zellen in das erkrankte Knorpelgewebe gelockt werden und anschließend optimal in die Matrix eingebettet sind (Gerter et al. 2012). Große Hoffnung in diese Zellen besteht weiterhin, da sie bereits lokal in erkranktem Gewebe vorhanden sind und somit fähig scheinen, selbst im späten Stadium der Arthrose zu überleben und folglich lediglich minimal-invasive Verfahren für die Therapie ausreichen könnten (Gerter et al. 2012). Infolgedessen könnten CPC zukünftig bei der Entwicklung einer regenerativen Therapie von Knorpeldefekten durch Einbringen einer geeigneten Matrix eine große Rolle spielen (Joos et al. 2013, Koelling et al. 2009).

1.5 Der Einsatz von Matrizes in der Knorpelregeneration

1.5.1 *In-situ*-Regeneration vs. Tissue Engineering von Knorpelgewebe

Bei regenerativen Therapieverfahren unterscheidet man zwischen der *In-situ*-Regeneration, die den Ansatz des zellfreien Transfers von synthetischen oder natürlichen Matrizes in einen Knorpeldefekt beinhaltet (Richter 2009), und dem Tissue Engineering, bei dem Matrizes verwendet werden, die zuvor mit Zellen besiedelt worden waren. Der Schwerpunkt lag hierbei in den vergangenen Jahren auf der Erhaltung und der funktionellen sowie strukturellen Wiederherstellung defekter Gewebe mithilfe von 3D-Scaffolds (Tuli et al. 2003, Tuan et al. 2003, Li et al. 2005, Glowacki & Mizuno 2008). Das verfolgte Ziel beim Tissue Engineering von Knorpel besteht in der Generierung eines Gewebes, das dem natürlichen Gelenkknorpel vergleichbare Eigenschaften aufweist und diesen Prozess mit einer geeigneten Matrix unterstützt (Kock et al. 2012). Der Schlüssel effektiven Engineerings mit vollständiger funktioneller Regeneration bleibt derzeit die Ermittlung des optimalen Arrangements von biologischem/synthetischem Material, Zelltypen und Biofaktoren, da die Beschaffenheit des Knorpels, der durch Tissue Engineering entstanden ist, von vielen unterschiedlichen Elementen abhängig ist (Benders et al. 2013, Mafi et al. 2012). Geeignete Scaffold-Matrizes für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe sollten möglichst die Mikroumgebung des nativen Gewebes nachbilden und als Analogon der EZM dienen. Dabei ist es erforderlich, dass sie aus einer bestimmten Oberflächenchemie und Architektur konstruiert sind, die einen Matrixum- und -abbau erlauben und letztendlich die Anlagerung, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen erleichtern und leiten (Tuli et al. 2003, Tuan et al. 2003, Lavik & Langer 2004, O'Brien et al. 2005). Zudem determinieren biomechanische und biologische Merkmale der Scaffold-Materialien die Beschaffenheit des neuen Knorpels, da diese auf die Zelldifferenzierung einwirken (Schuh et al. 2010, Kock et al. 2012). Ein großer Nachteil des Tissue Engineering ist das zweizeitige Vorgehen inklusive autologer Zellentnahme, Besiedlung, Inkubation der jeweiligen Matrix zur Zellproliferation sowie schließlich der Zell-Matrix-Implantation *in vivo*, die folglich einen größeren zeitlichen und ökonomischen Rahmen umfasst (Tuli et al. 2003, Tuan et al. 2003, Li et al. 2005, Glowacki & Mizuno 2008). Demgegenüber bietet die *In-situ*-Regeneration wie das

AMIC-Verfahren eine kosteneffektive Option, die primär einen einzeitigen Eingriff erfordert (Benthien & Behrens 2011). Allerdings ist die Matrixzusammensetzung mit Kollagen Typ I und III im Bezug auf das Knorpelgewebe unphysiologisch (Benthien & Behrens 2010, Gille et al. 2010), wodurch sich die Frage stellt, ob AMIC dazu geeignet ist, eine dem natürlichen Knorpelgewebe ähnliche und funktionell nachaltige Matrix zu bilden. Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der *In-situ*-Regeneration und des Tissue Engineering besteht also für die passenden Biomaterialien zur Regeneration von Knorpelgewebe weiterhin Optimierungsbedarf (Benders et al. 2013, Tuli et al. 2003).

1.5.2 Xenogene EZM-Scaffolds

Durch ein global bedeutendes Interesse am Ersatz von Knorpelgewebe ist dies zu einem Hauptziel in der Forschung des Tissue Engineering avanciert (Rotter et al. 2005 und 2007). Allerdings bietet sich lediglich eine begrenzte Verfügbarkeit an geeigneten autologen und allogenen Spendergeweben an (Langer & Vacanti 1993, Rotter et al. 2007, Duda et al. 2000, Vacanti & Vacanti 1994, Rotter et al. 2005), daher könnte xenogenes Gewebe als Alternative dienen. Unter EZM-Scaffolds werden natürliche, azelluläre, dreidimensionale ineinandergreifende, poröse Materialien verstanden, die bspw. von der EZM des Knorpels stammen (Yang et al. 2008). Die Zusammensetzung dieser Bioscaffolds beinhaltet strukturelle und funktionelle Proteine, die Bestandteile nativer, von Säugetieren stammender EZM darstellen. Die dreidimensionale Struktur unterscheidet EZM-Scaffolds von synthetisch hergestellten (Badylak 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften könnten die o.g. Scaffolds eine Grundlage für ein nützliches und effektives Gewebe-Remodelling bieten, das im Gegensatz zur häufig erfolgenden Bildung von Narbengewebe stünde (Badylak 2002, Badylak 2004).

1.5.2.1 Dezellularisierte Scaffolds aus Schweine-Nasensepten als Möglichkeit einer geeigneten Biomatrix

Eine vielversprechende neue Matrix stellen *porcine nasal septal cartilage*- (pNSC) Scaffolds dar, die aus Schweinenasensepten gewonnen, einem Dezellularisierungsprozess unterzogen und zu zylindrischen Scheiben (d = 5 mm, h = 1 mm) verarbeitet werden (Schwarz et al. 2012). Durch die Gefahr der Krankheitsübertragung und des Infektionsrisikos durch allo- und xenogenes Knorpelgewebe, sind umfassende Sterilisierungsverfahren vonnöten (Marreco et al. 2004). Für eine klinische Anwendung muss jedoch jegliche/s Krankheitsübertragung und Infektionsrisiko ausgeschalten und Antigenität sowie Immunreaktionen, die durch vorhandene Zellen verursacht werden, mittels gründlicher Dezellularisierung und Entfernung aller antigen wirkenden Komponenten verhindert werden (Gonçalves et al. 2005, Stone et al. 1998). Daher besteht das Ziel in der Herstellung von dreidimensionalen chondrokonduktiven, naturreinen Kollagenscaffolds, die u. a. in der Orthopädie klinisch angewandt werden können (Breiter 2010b, Breiter 2010a): Hierfür sind starke chemische Substanzen für eine effektive Dekontamination und Inaktivierung des Ausgangsmaterials erforderlich (Bauman et al. 2006).

Zusammenfassend ist die Matrix der pNSC-Scaffolds im Speziellen nach Durchführung des Dezellularisierungs- und Sterilisierungsprozesses (DP) (Breiter 2010b, Breiter 2010a) nach Breiter et al. durch vollständige Dekontamination und Sterilisierung erregerfrei, nicht zytotoxisch und steril. Desweiteren haben die pNSC-Scaffolds einen geringen GAG-Gehalt bei Erhaltung der ursprünglichen fibrillären Kollagen II-Struktur in Form und Größe, sodass sie eine hohe mechanische Stabilität und Steifigkeit aufweisen. Zudem besitzen sie eine Porengröße nahe dem ursprünglichen pNSC-Knorpel und üben keinen signifikanten Einfluss auf Zellwachstum und -metabolismus von *human primary nasal chondrocytes* (hPCh) und von Mäusen stammenden Fibrosarkom-Zellen aus (Schwarz et al. 2012).

1.5.2.2 Vorteile von Kollagen als EZM-Ersatz im Allgemeinen sowie im Speziellen von Typ II

Kollagen wird heutzutage als eines der am meisten bevorzugten Grundstoffe für den natürlichen EZM-Ersatz betrachtet und ist seit vielen Jahren als Biomaterial in einer Vielfalt von Anwendungen im Bereich des Connective Tissue Engineering (Song et al. 2006) und in weiteren Gebieten des Bioengineering im Einsatz (Lee et al. 2001, Friess 1998, Riesle et al. 1998, Venugopal et al. 2005, Ma et al. 2004, Meaney Murray et al. 2003, Angele et al. 2004). Dies ist der Tatsache geschuldet, dass Kollagen etliche Voraussetzungen erfüllt, die für die Herstellung und Anwendung der Scaffolds unverzichtbar sind: Sie bieten sowohl passende Signale zur Steuerung zellulärer Prozesse, die zur Gewebebildung führen, eine geringe Antigenität, eine ideale Biokompatibilität und eine hohe Biodegradibilität (Song et al. 2006, Andrades et al. 1999, Lee et al. 2001, Friess 1998). Kollagen-Typ-II-Matrizes spielen dabei eine besondere Rolle für Anwendungen im Knorpelbereich, da bereits gezeigt wurde, dass im Vergleich zu Kollagen-Typ-I- bzw. Alginat-Matrizes nach Besiedlung mit Chondrozyten bzw. MSC eine signifikant höhere Prozentzahl an Zellen mit sphärischer, i.e. chondrozytischer Morphologie, und insgesamt eine größere biosynthetische Aktivität bzgl. Proteoglykanen und Kollagen Typ II vorhanden war (Nehrer et al. 1997, Bosnakovski et al. 2006). Hingegen liegt der Nachteil synthetischer Polymere darin, dass Zellen in ihnen häufig ihren chondrogenen Phänotyp verlieren und daher eine verminderte Knorpel-Biosynthese zeigen (Chen et al. 2003), natürliche Scaffoldmaterialien aber, insbesondere jene aus biologischen Präparaten angefertigte, eine natürliche EZM-Neubildung mit Konstrukt-Heranreifung zu zeigen scheinen (Chung et al. 2006, Burdick et al. 2005, Li et al. 2005, Welsch et al. 2010).

1.6 Ziel: Therapeutische Rekonstruktion von Knorpeldefekten

Klinisch, ökonomisch und gesellschaftlich haben speziell traumabedingte Knorpeldefekte durch die nachfolgende Entwicklung sekundärer Arthrosen eine hohe Relevanz (Woolf & Pfleger 2003, Benders et al. 2013, Felson 2006, Swiontkowski & Chapman 1995). Wie bereits beschrieben, gibt es allerdings nur begrenzte therapeutische Möglichkeiten an dieser Stelle kurativ einzugreifen, die

langfristig gesehen jedoch größtenteils unbefriedigende Resultate erzielen. Daher ist es von Interesse therapeutische Alternativen zu testen. Die erst kürzlich beschriebenen chondrogenen und migratorisch aktiven CPC stellen eine viel versprechende Zellpopulation für die *In situ*-Regeneration dar, da sie in der Lage sind, aktiv aus nativem Knorpelgewebe auszuwandern und in einen chondrozytären Phänotypen zu differenzieren (Joos et al. 2013). Desweiteren wurde von Breiter et al. eine neue, vielversprechende Kollagen-II-Matrix aus Schweinenasenseptum, die pNSC-Scaffolds, vorgestellt, die aussichtsreiche Eigenschaften als Implantat für die Behandlung von Knorpeldefekten aufweist. Das Ziel der Arbeit war es nun zu testen, ob eine Besiedlung dieser pNSC-Matrix mittels CPC aus humanem Knorpel *in vitro* möglich ist und sich ein pNSC-Implantat für die *In situ*-Regeneration als zukünftige Therapie-Alternative von Knorpeldefekten prinzipiell eignet. Dabei wurden das Adhäsions-/Proliferations-(Zellschichtbildung), Einwanderungsverhalten (Migration) und die Matrixsynthese (Kollagene Typ I, II, X und Aggrekan) der Zellen untersucht.

In dieser Arbeit soll beantwortet werden, ob es möglich ist, die pNSC-Scaffolds mit CPC zu besiedeln. Desweiteren ist das Ziel zu klären, ob CPC dazu in der Lage sind, innerhalb der Scaffolds knorpeltypische Matrixkomponenten zu synthetisieren und welches Medium den Rezellularisierungsprozess und die Matrixbildung am besten unterstützt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengut

Die zur Besiedelung der Scaffolds benötigten CPC wurden aus Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren, welche aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt wurden. Hierbei wurde der makroskopisch intakte Gelenkknorpel von den Femurkondylen und den Tibiaplateaus entnommen. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Für die Materialasservierung lag eine Zustimmung der Ethikkommission vor. Alle Patienten wurden präoperativ durch den zuständigen Stationsarzt über die Knie-TEP-Operation und den damit verbundenen Ersatz des medialen und lateralen Hauptkompartiments des Kniegelenks sowie die Verwendeung des normalerweise zu verwerfenden Restgewebes für wissenschaftliche Zwecke inkl. der Gewinnung von Zellen aufgeklärt. Nach der erforderlichen Zustimmung der Patienten gemäß der Richtlinien der Ethikkommission der Universität Ulm konnte die Gewinnung der Zellen, i.e. CPC aus dem oben genannten Patientenmaterial erfolgen.

2.1.2 pNSC-Scaffolds

Die in dieser Arbeit verwendeten pNSC-Scaffolds wurden durch die Erlanger Arbeitsgruppe Breiter & Körber entwickelt (Dr. Roman Breiter und Dr. Ludwig Körber, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) und nach vollständiger Aufbereitung von der Arbeitsgruppe Rotter & Schwarz freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Prof. Dr. med. Nicole Rotter und Dr. Silke Schwarz, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm). Die pNSC-Scaffolds werden einem intensiven Dezellularisierungsprozess unterzogen, um schließlich ein zellfreies Präparat zu erhalten (Schwarz et al. 2012). Um eine potentielle Krankheitsübertragung und das Infektionsrisiko durch allo- und xenogenes

Knorpelgewebe zu vermeiden, sind umfassende Sterilisierungsverfahren vonnöten (Marreco et al. 2004). Hierfür sind starke chemische Substanzen für eine effektive Dekontamination und Inaktivierung des Ausgangsmaterials erforderlich (Bauman et al. 2006). Ein Baustein dieses Verfahrens ist Natriumhydroxid (NaOH), das zur Gewebeschwellung führt und die Entfernung von Zellen und Zelltrümmern erleichtert (Vickery et al. 1999). Es inaktiviert Prionen (Bauman et al. 2006, Käsermann & Kempf 2003, Unal et al. 2007), die insbesondere Verursacher einiger neurodegenerativer Erkrankungen sind und normalerweise gegen eine Vielzahl an Pathogeninaktivierungs- und Sterilisierungstechniken, wie z. B. radioaktive Strahlung resistent sind (Hotz et al. 1999). NaOH eliminiert sie und entfernt humanpathogene Viren wie HIV, HAV, HBV, HCV und DNA/RNA (Borovec et al. 1998, Ernst & Race 1993, Taguchi et al. 1991). Zusätzlich erfolgt die Anwendung von H_2O_2 zur Gewebesterilisierung wie auch zur Inaktivierung und Beseitigung von Mikroorganismen wie Hefen, Pilze und Sporen. Obendrein erweist es eine hohe Effektivität gegen eine Vielzahl von Viren (HIV-1, HAV, RSV, Vaccinia-Viren und HSV-1) (Vickery et al. 1999).

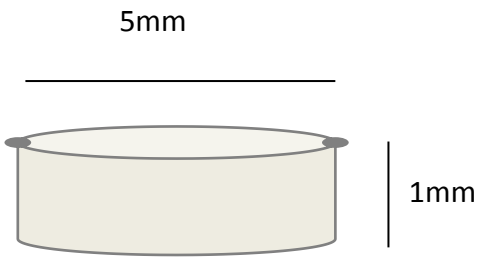


Abbildung 3: ***Maße und schematisierte Darstellung eines unbesiedelten, prozessierten pNSC-Scaffolds. Die Scaffolds wurden zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen chondrogenen Progenitorzellen am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012–12/2012 verwendet und durch die Erlanger Arbeitsgruppe Breiter & Körber entwickelt (Dr. Roman Breiter und Dr. Ludwig Körber, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg). Nach vollständiger Aufbereitung wurden die Scaffolds von der Arbeitsgruppe Rotter & Schwarz freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Prof. Dr. med. Nicole Rotter und Dr. Silke Schwarz, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinik Ulm). PNSC: Porcine nasal septal cartilage.***



Abbildung 4: ***Unbesiedelte, prozessierte pNSC-Scaffolds, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen chondrogenen Progenitorzellen am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012–12/2012 verwendet und durch die Erlanger Arbeitsgruppe Breiter & Körber entwickelt wurden (Dr. Roman Breiter und Dr. Ludwig Körber, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg). Nach vollständiger Aufbereitung wurden die Scaffolds von der Arbeitsgruppe Rotter & Schwarz freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Prof. Dr. med. Nicole Rotter und Dr. Silke Schwarz, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm. PNSC: Porcine nasal septal cartilage.***

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterialien	**Firma**
• Filterspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl („Maxymum Recovery“) • Pipetten: 1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	• ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland

• Hammer FL062R • Pinzetten: - chirurgisch: BD539R - spitz zulaufend: BD520R • Skalpellklingen FIG.23	• Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
• Waage Precisa 400 M	• Altenrath GmbH, Wuppertal, Deutschland
• Schere AS S11-001-13	• AS Medizintechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland
• Labor-Kugelmühle Mikrodismembrator S Type 853152/8 Nr./Jahr 00146/96	• B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
• Falcon Petrischalen • Falcon Zellkulturflasche T75 • Falcon Zellkulturflasche T175 • Falcon Zellkulturplatten „6-Well“, „12-Well“, 24-Well“, „24-Well Low Attachment“, „96-Well“ • Falcon-Zentrifugenröhrchen 15ml, High-Clarity Polypropylene Conical Tube • Falcon-Zentrifugenröhrchen 50 ml, Polypropylene Conical Tube • Filtereinheiten blau 40 µm, (BD Falcon Cell Strainer)	• BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
• Zentrifugen: - Hochgeschwindigkeits-Laborzentrifuge Allegra® 64R	• Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

- System: GS-15 Instance-Nr.: 821 948 Serien-Nr.: GYD 96 J 06	
• Rohrzange Belzer-Polygrip Nr. 2565 M	• BELZER-Werk, Wuppertal-Cronenberg, Deutschland
• Vortexer neoLab, Modell 7-2020	• Bender & Hobein GmbH, Ulm, Deutschland
• Inkubator Art.-Nr.: 9010-0078 ED53, Serien-Nr.: 07-17250	• BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
• Elektrophoresekammer AGAgel Standard ohne Kühlung • Elektrophoresekammer 10 cm Stromgenerator Modell P25, Powerpack Order, Nr.: 040-800 Serien-Nr.: 3707144	• Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
• PCR Tube Strips • Reaktionsgefäße 1,5 ml	• Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
• Ultraschall-Reinigungs-Gerät Branson2200	• Branson Ultrasonics, Americas Headquarters Danbury, USA
• Digitalkamera EOS300D	• Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
• Mikroskop Axioskop 2 Mot Plus • Mikroskop Axiovert 35	• Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
• Kälteschutzhandschuhe Marigold Industrial	• Comasec International Group, Gennevilliers,

	Frankreich
• Serologische Pipetten Stripette™ 5 ml / 10 ml / 25 ml	• Costar Corning B.V., NE Schiphol-Rijk, Holland (VWR Deutschland)
• Reaktionsgefäße: - Bechergläser Schott Duran 100 ml, 200 ml - Erlenmeyerkolben Schott Duran 200ml, 500ml, 1000ml	• Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
• epT.I.P.S singles 2-200 µl sterile Spitzen, einzeln • epT.I.P.S singles 50-1000 µl sterile Spitzen, einzeln	• Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
• Wasserbad GFL 1083	• GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
• Kryoröhrchen Cellstar (Einfrierröhrchen), Polypropylen, mit Schraubverschluss, steril, 2 ml	• Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
• Inkubator BBD G220 • Sterilbank Laminair	• Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
• Biofuge 13	• Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
• Pipettierhilfe „Pipetus“	• Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG, Eberstadt, Deutschland
• Magnetrührer IKAMAG	• IKA Staufen, Deutschland
• Megafuge 1.0 Heraeus,	• Kendro Laboratory Products

Baujahr 2003 • Sterilbank Heraeus Hera Safe Type HS 18 Serien-Nr.: 9910 2553	GmbH, Hanau, Deutschland
• Dewar-Gefäße	• KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk-Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• Kimtech-Science Labortücher	• Kimberley-Clarke Europe, Großbritannien
• Wasserbad Laktotherm 1, Modell LTH 38 23 12, BJ ´88, Serien-Nr. : 1224	• Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm, Deutschland
• Prozessierter i.e. dezellularisierter und steriler Knorpel aus Schweine-Nasen-Septen, pNSC- *(porcine nasal septal cartilage)* Scaffolds	• Institute of Bioprocess Engineering der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
• Tissue Embedding Medium Paraplast Plus	• Leica Biosystems Richmond Incorporated, Richmond, USA
• Ausgießstation Leica EG1140 H • Histokinette Reichert-Jung 2050 • Kühlplatte Leica EG 1140 C • Mikrotom Reichert-Jung Supercut 2050	• Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
• Mikrowelle LG Modell-Nr.: MS-192A, Serien-Nr.: 006 NE 01981	• LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland
• Kühl-Gefrier-Kombination	• Liebherr, Ochsenhausen,

Premium NoFrost GSN 3336 • Kühlschrank Liebherr Comfort	Deutschland
• StepOnePlus™, Real-Time PCR-Gerät	• Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
• Wärmeplatte Typ 13800 • Wasserbad MEDAX Typ 24900	• Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
• Inkubator memmert	• Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
• Desinfector Automatic G7735	• Miele & Cie. KG
• ART (= Aerosol Resistant Tips) 10 Reach Pipette Tips • Filterspitzen ART 20E, 200	• Molecular Bio Products (MβP), Kent, Großbritannien
• Stickstofftank EG-Nr.: 231-783-9	• MTI IndustrieGase AG, Neu-Ulm, Deutschland
• Deckgläser • Objektträger	• Paul Marienfeld GmbH + Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
• UV/Vis-Spektralphotometer ND-1000	• PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
• Mikrotomklingen C-35 FEATHER	• pfm medical ag, Köln, Deutschland
• QiaShredder-Säulen	• Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
• Feinwaage • Mahlkugeln aus Chromstahl	• Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Durchmesser 9 mm	
• Zellzählgerät Casy1, Modell TT	• Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
• Histosette Einbettkassetten	• Simport GmbH, Beloeil, Kanada
• Robocycler Gradient 96	• Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
• Klingenhalter bzw. Skalpellgriff Swann Morton BS2982	• Swann-Morton Limited, Sheffield, England
• Autoklav Type DX-45	• Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
• Gefrierschrank (-80 °C) Basic Freezer HFU 2585SI	• Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
• Nalgene-Kryoröhrchen Cat.No.: 5000-0012 Lot.No.: 1084147	• Thermo Fisher Scientific Incorporated, Rochester, New York, USA
• Schutzbrille Uvex Optidur	• Uvex Winter Holding GmbH + Co. KG, Fürth, Deutschland
• Reaktionsgefäß: - Zylinder 100ml	• VITLAB GmbH, Großostheim, Deutschland
• Kühlschrank	• VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Faltenfilter	• Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

2.2 Verwendete Chemikalien und Kits

Chemikalien/Kits	Firma
• Na_2EDTA (Element für TBE-Puffer)	• AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Power SYBR® Green PCR Master Mix (18S) • TaqMan® Gene Expression Master Mix • TaqMan® Universal Master Mix II with UNG, Part No. 444 0038 (ACAN, COL2A1, COL10A1)	• Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
• *Dulbecco´s modified eagle medium* (DMEM), Flüssigmedium mit 1,0 g/l D-Glukose, mit 3,7 g/l NaHCO3, ohne L-Glutamin • *Dulbecco´s modified eagle medium* (DMEM), Flüssigmedium mit 4,5 g/l D-Glukose, mit 3,7 g/l NaHCO3, ohne L-Glutamin • Fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE) • Trypsin/EDTA Solution (0,05 %/0,02 % w/v in PBS ohne Ca2+, Mg2+) (Cat. No. L2143, Lot. No. 0358W)	• Biochrom AG, Berlin, Deutschland
• β-Mercaptoethanol • DMSO 0,1 % (Dimethylsulfoxid, Art. No. A994.2) • Formaldehydlösung 37 %	• Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

• AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Substrat-Chromogen (ready to use) • Antibody Diluent with Background Reducing Components • Biotinylated Link (Brücken-Antikörper) • Protein Block • Streptavidin	• DAKO Corporation, Carpinteria, USA bzw. DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
• Ribonuklease Inhibitor (RNase Inhibitor)	• GeneOn GmbH Ludwigshafen, Deutschland
• Safranin- O 0,1 %	• Fisher Scientific Company S-670, New Jersey, USA
• Ethidiumbromid 10 mg/ml bzw. 1 %, wässrige Lösung • Kernechtrot in Aluminiumsulfat	• Fluka AG, Buchs, Schweiz
• Platinum® SYBR® Green (COL1A1)	• Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• KAPA2G Fast ReadyMix with dye	• Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA
• Agarose (Cat. No. 50004)	• Lonza, Rockland, ME USA
• di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei • Eisenchlorid (Fe-Chlorid ($FeCl_3x6H_2O$, Merck 3946)) • Essigsäure 100 % (Eisessig) • Extran • Isopropanol 99 % • Kaiser´s Glyceringelatine	• Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

• Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat • Salzsäure rauchend 37 %	
• Brij 35	• Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
• StemMACS ChondroDiff Media (benannt als Nichthämatogenes (NH) Differenzierungsmedium) Stammzellmedium für humane Knochenmarks-/Bindegewebszellen inklusive: DMEM, Fetal Bovine Serum, L-Glutamine, Supplemente (lt. Herstellerangaben u. a. L-Ascorbinsäure)	• Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
• Isopropanol 99 %	• Ölfabrik Lahr Wilhelm Schmidt GmbH & Co. KG, Lahr/Schwarzwald, Deutschland
• Eukitt	• O. Kindler GmbH + Co., Freiburg, Deutschland
• Wasserstoffperoxid 30 %	• Otto Fischar GmbH + Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
• L-Glutamin, flüssig (200 mM) (Cat. No. M11-004, Lot. No. M00412-3274) • Penicillin/Streptomycin (Cat. No. P11-010, Lot. No. P01010-	• PAA Laboratories GmbH The Cell Culture Company, Pasching, Österreich

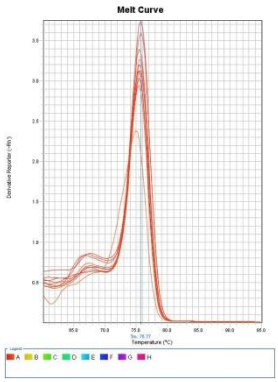
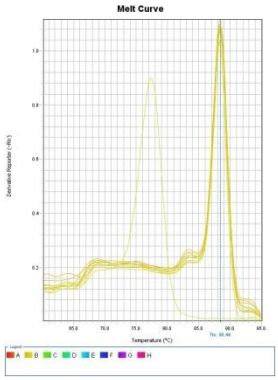
3161) • Phosphat-gepufferte Salzlösung Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca/Mg, steril (Cat. No. H15-002)	
• TGF-β3 (Wachstumsfaktor)	• PeproTech, New Jersey, USA
• 100bp DNA-Leiter (Lot. No. 48882)	• PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
• Omniscript RT Kit (200) (Cat. No. 205113, Lot. No.145012291) • Rnase-Free Dnase Set (50) (Cat. No. 79254) • Rneasy Lipid Tissue Mini Kit (50) (Cat. No. 74804, Lot. No. 142352324) • Rneasy Mini Kit (250) (Cat. No. 74106, Lot. No. 139289367)	• Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
• Qiazol	• Qiagen Sciences, Maryland, USA
• *insulin-transferrin-sodium selenite supplement* (ITS)	• Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
• Aceton (Lot. No. SZBC1025V)	• Sigma-Aldrich Chemie

• Alcianblau 8GX 1 % • Aminopropyltriethoxysilan 2 % (Lot. No. BCBC2010V) • Borsäure, pH 8,3 (Element für TBE-Puffer) • Bovines Serumalbumin (BSA) • Chloroform • DEPC (Diethylpyrocarbonat) • Ethanol, absolut • Fluka 44970, Eisensulfat (Fe-Sulfat) • Hyaluronidase *Sigma-H3506* • Mayer´s Hämatoxylin • Pepsin (porcine gastric mucosa) 1mg/ml • *Phosphate buffered saline* pH 7,4, Pulver (PBS) • Saures Eisenhämatoxylin (Weigert) • Sigma-*Aldrich-F7258* Fast Green • Tris base (Element für TBE-Puffer) • Xylol, Isomerengemisch	GmbH, Steinheim, Deutschland bzw. Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

2.3 Primer

2.3.1 Primer zur relativen Quantifizierung mit SYBR-Green

Tabelle 1: ***Primer zur relativen Quantifizierung mit SYBR-Green zum Nachweis doppelsträngiger DNA eingesetzt. SYBR-Green: 2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl- 1H-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation; DNA: Desoxyribonukleinsäure; 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; bp: Basenpaare; COL1A1: Kollagen Typ I.***

Gen GenBank-Zugangsnummer	**Primersequenz 5´-3´**	**Produktgröße**	**Schmelzkurve**
18S rRNA NR_003286.2	f CGCAGCTAGGAATAATGGAATAGG r CATGGCCTCAGTTCCGAAA	65 bp	
COL1A1 NM_000088.3	f GGCCCAGAAGAACTGGTACA r CGCTGTTCTTGCAGTGGTAG	200 bp	

2.3.2 TaqMan® Gene Expression Assays für relative Quantifizierung mit internen Oligonukleotid- Sonden

Die TaqMan® Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems (Life Technologies, USA), die verwendet wurden, enthalten eine 6-Carboxyfluorescein-(FAM™) markierteTaqMan® Sonde am 5'-Ende, einen an die die kleine Furche bindenen nicht-fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende und ein Paar unmarkierter PCR-Primer.

Tabelle 2: ***TaqMan® Gene Expression Assays***

Gen **GenBank-Zugangsnummer**	**Assay-ID (Applied Biosystems)**	**Produktgröße**
Aggrekan (ACAN) NM_001135.3	Hs00153936_m1	91 bp
COL2A1	Hs00264051_m1	124 bp
COL10A1	Hs00166657_m1	76 bp

Ergänzend sei noch erwähnt, dass der Ct-Wert auf 40 gesetzt wurde, wenn bei der quantitativen Genexpressionsanalyse kein Produkt nachgewiesen werden konnte.

2.4 Antikörper

Tabelle 3: ***Für Immunfärbungen verwendete Antikörper. BSA: Bovines Serumalbumin.***

Antigen	**Spezies**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Kollagen Typ I	Kaninchen (polyklonal)	1:100	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland (26.03.2013); Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland (19.01.2006) Lot-Nr.: A130082BH
Kollagen Typ II (Purified Antibody with BSA and Acide)	Maus (monoklonal)	1:100	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland bzw. Thermo Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, Kalifornien, USA (12.06.2013) BIN-Nr.: A-27-88 Cat.MS 306-PO, Serial/Batch/306P1208)
Kollagen Typ X	Maus (monoklonal)	1:10	Quartett GmbH, Berlin, Deutschland

2.5 Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien, Wachstumsfaktor

2.5.1 TBE-Puffer für die Agarose-Gelektrophorese

108	g	Tris base
55	g	Borsäure, pH 8,3
9,3	g	Na_2EDTA

ad 10 l H_2O dest

2.5.2 Zellkultur

2.5.2.1 Basalmedium (BM)

440	ml	DMEM „low glucose“ (1g/L Glucose)
50	ml	Fötales Kälberserum (FKS) (hitzeinaktiviert) (10 %)
5	ml	L-Glutamin (1 %)
5	ml	Penicillin/Streptomycin (1 %)

Gelagert wurde das Basalmedium bei 4 °C im Kühlschrank und vor jedem Gebrauch im 37 °C Wasserbad aufgewärmt.

2.5.2.2 Chondrogenes Differenzierungsmedium (CDM), serumfrei

384	ml	DMEM „high glucose“ (4,5 g/l Glucose)
0,04	ml	Dexamethason (0,1 µM)
0,4	ml	ITS (5 µg/mL Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/mL Sodium Selenite)
4	ml	L-Ascorbinsäure (0,2 mM)
4	ml	L-Glutamin (2 mM)
0,4	ml	L-Prolin (40 µg/ml)
4	ml	Natriumpyruvat (1 mM)
4	ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/100 µg/ml)

0,01 ml TGF-β3 (10 ng/mL) nach jedem Auftauen frisch zugeben
Gelagert wurde das CDM bei -20 °C und vor jedem Gebrauch im 37 °C Wasserbad aufgetaut.

2.5.2.3 Hitzeinaktivierung des Fötalen Kälberserums (FKS)

Gefrorenes FKS wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut und bei 56 °C für 30 min erhitzt. Anschließend wurden Aliquots von 50 ml portioniert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Lösungen für Histologie

2.5.3.1 Saures Eisenhämatoxylin

149 ml Aqua dest.

1 ml konzentrierte Salzsäure (37 %, rauchend)

1,25 g Eisenchlorid (Fe-Chlorid ($FeCl_3x6H_2O$))

2,25 g Eisensulfat (Fe-Sulfat ($FeSO_4x7H_2O$))

Nach Lösen der Salze wurden 50 ml einer 1 %-igen frischen, alkoholischen (96 % Ethanol) Hämatoxylin-Lösung (Weigert A) zugegeben. Die Lösung ist zunächst blauschwarz und wird nach mehreren Wochen braun.

2.5.3.2 Fastgreen (1 : 5000)

0,1 g des Pulvers wurden mit 500 ml Aqua dest. verrührt, bis eine homogene Mischung entstanden war.

2.5.3.3 Safranin-O

Eine 0,1 %-ige Lösung wurde mittels Aqua dest. hergestellt und mit Salzsäure auf einen pH-Wert < 3 eingestellt.

2.5.4 Fixierlösung für Histologie (Formalin nach Lillie)

4 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

6,5 g di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei

100 ml Formaldehydlösung 37 %

---

ad 1000 ml H_2O dest.; pH 7,0 mit Indikatorpapier überprüfen

2.6 Computerprogramme

• StepOneTM Software Version 2.2.2	• Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Quantity One 1D Analysis Software, Version 4.6	• Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
• AxioVision 4.8.2 (06 – 2010) Bildanalyse Software	• Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
• GraphPad Prism 5.0	• GraphPad Software Inc La Jolla, CA, USA
• Nano Drop ND1000, Version 3.5.2	• PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.7 Methoden

2.7.1 Zellkultur

2.7.1.1 Isolation und Kultivierung von chondrogenen Progenitorzellen (CPC) aus dem humanen Knorpel

Die Knorpelchips, die von makroskopisch intaktem Knorpelgewebe aus humanen Kniegelenken mittels Skalpell so flach wie möglich geschnitten wurden, um eine möglichst große Fläche für das Auswachsen der Zellen zu gewährleisten, wurden zunächst sofort in *phosphate buffered saline* (PBS) überführt, um ein Austrocknen der Knorpelstücke zu vermeiden. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Kantenlänge der Stücke ca. 2-3 mm betrug. Anschließend wurden 6-Well-Platten vorbereitet, um 6-7 Knorpelchips pro Well mittig in die Platten zu legen. Dabei war es wichtig, dass der Knorpel flach auf der Plastikoberfläche der Wells zu liegen kam, die Stücke sich nicht überlagerten und die Bodenfläche der BD Filtereinheiten (40 µm) von diesen nicht überragt wurden. Nun wurde der Filter auf die vorbereiteten Knorpelchips gelegt, um den Bodenkontakt des Knorpels zum Well sicherzustellen und somit ein möglichst optimales Auswachsen der chondrogenen Progenitorzellen zu gewährleisten und es wurden 3 ml Basalmedium (s. 2.6.2.1) pro Well vorsichtig in die Mitte des Filters hinzugefügt.

Zuletzt wurden die Knorpelchips ca. 8-10 Tage lang bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert. Hierbei war eine regelmäßige Kontrolle der 6-Well-Platten mit dem Lichtmikroskop vonnöten, um das Auswachsen der Zellen zu verfolgen, i.e. diese nicht zu dicht wachsen zu lassen, und infolgedessen bei Bedarf rechtzeitig trypsinisieren und in den größeren T75 cm² Flaschen weiter kultivieren zu können. Der Medienwechsel erfolgte einmal pro Woche, wobei das Medium nur soweit abgesaugt wurde, dass die Filtereinheiten noch mit Medium bedeckt waren, um Luftblasen und damit eine Behinderung des Auswachsens der Zellen zu vermeiden. Ab Passage 1, i.e. bei erfolgter Überführung der Zellen in einer T75 cm² Kulturflasche, erfolgte der Medienwechsel zweimal pro Woche. Die CPC wurden bei einer Konfluenz von max. 70 % (ca. 1,2 x 10^4 Zellen/cm²) im Verhältnis 1:3 passagiert.

2.7.1.2 Zellpassagierung

Beim Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium gänzlich abgenommen, um anschließend den Boden der Zellkulturflasche zweimal mit jeweils 10 ml PBS zu spülen. Als Nächstes wurden die adhärenten Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA 7 min bei 37 °C vom Boden der Flasche gelöst. Damit möglichst alle Zellen in Suspension gebracht wurden, wurde mehrmals nachdrücklich an die Wände der Zellkulturflasche geklopft und die Zellablösung per Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde die Trypsin/EDTA-Zellsuspension mit mindestens ebenfalls 2 ml Basalmedium abgestoppt und 10 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit frischem Basalmedium resuspendiert und je nach Zelldichte in eine unterschiedlich große Anzahl neuer Zellkulturflaschen ausgesät.

2.7.1.1 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton pipettiert und mittels des Zellzählgerätes Casy1 Modell TT die Zellkonzentration pro ml ermittelt.

2.7.1.2 Kryokonservierung, Langzeitlagerung und Auftauen

Zur Erhaltung früher Zellpassagen wurden die hauptsächlich verwendeten CPC, wie bereits oben unter Punkt 2.8.1.3 Zellpassagierung beschrieben, zunächst trypsinisiert, gezählt und pelletiert. Je Kryoröhrchen wurden die Zellen in einer Konzentration bis max. 2 x 10^6 Zellen pro ml, meist jedoch bis 1 x 10^6 Zellen pro ml, in Freeze-Medium, i.e. Basalmedium mit 5 % DMSO, resuspendiert. Die Kryoröhrchen mit Zellsuspension wurden entweder für 24 h in der Gasphase im Stickstoffbehälter belassen und nach Ablauf dieser Zeit zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff des selben Behälters gegeben oder sie wurden zunächst ebenfalls für 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox bei -80 °C aufbewahrt, sodass die Zellen bei 1 °C pro Minute gleichmäßig abkühlten und anschließend in flüssigem Stickstoff im Stickstoffbehälter zur Langzeitlagerung gegeben wurden. Beim Auftauen der Zellen in den Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff wurden diese so lange ins Wasserbad bei 37 °C gestellt, bis die Proben angetaut waren und gerade noch ein kleiner Eisklumpen innerhalb des Röhrchens sichtbar war. Daraufhin wurden die Zellen sofort in bereits vorbereitetes mit 10 ml Basalmedium gefülltes 50 ml-Falconröhrchen überführt und anschließend bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Verwerfung des Überstandes und die Resuspension in frischem Basalmedium. Zum Schluss wurde die Zellsuspension durch weitere Zugabe von Basalmedium auf das gewünschte Gesamtvolumen aufgefüllt, in Zellkulturflaschen überführt (bei 75 cm² max. 300 000 Zellen insgesamt bzw. bei 175 cm² max. 600 000 Zellen ausgesät) und bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert. Mediumswechsel erfolgte alle 3-4 Tage, i. e. zweimal pro Woche.

2.7.2 Besiedlung von pNSC–Scaffolds mit humanen CPC

Vor der Besiedelung der Scaffolds wurden diese zur Desinfektion bzw. Reinigung mindestens einen Tag vor dem geplanten Versuch 1 h lang in 75 %-igem Isopropanol bei Raumtemperatur unter der Sterilbank in einer 12-Well-Platte mit 4 Scaffolds pro Well inkubiert, um bakterielle Infektionen bei möglicherweise erworbenen Kontaminationen durch den Transport und das Auftauen auszuschließen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Isopropanol aus dem Well

abgezogen, verworfen und die Scaffolds bei geschlossenem Deckel der Well-Platte für ca. 30 min unter der Sterilbank getrocknet. Über Nacht wurden je vier Scaffolds pro Well für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in 1 ml Basalmedium gegeben und bis zum Gebrauch inkubiert, um den pH-Wert anzupassen und die Scaffold-Matrix zu rehydrieren. Am Versuchstag wurde vor der Besiedelung das Medium aus den Wells abgezogen und die Scaffolds mit Hilfe einer sterilen Uhrmacherpinzette einzeln in eine 96-Well-Platte überführt. An dieser Stelle war darauf zu achten, pro Well jeweils einen Scaffold direkt auf den Boden zu legen. Die CPC der 2 verschiedenen gepoolten Spender pro Versuch, die bis zum Versuchstag höchstens Passage 4 erreicht hatten, wurden mit Trypsin/EDTA aus der Zellkulturflasche mit jeweils 2 ml pro Flasche abgelöst, mit mindestens 2 ml Basalmedium abgestoppt und mit dem Zellzählgerät Casy1 Modell TT deren Zellanzahl pro Spender getrennt bestimmt. Parallel zur Zellzahlbestimmung erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 10 min und im Anschluss das Verwerfen des Überstandes mit dem Verbleib der Zellpellets. Mit der Zellzahlbestimmung fiel gleichzeitig die Entscheidung, welche Anzahl von Scaffolds besiedelt wurde sowie welche Kulturmedien bei einer erforderlichen Absolutzahl von 0,5 Mio. Zellen pro Scaffold in einer Zellsuspension von 150 µl - dies entspricht einer Konzentration von 3,3 Mio. Zellen pro ml - in Frage kamen. Aus den oben genannten Zahlen wurde somit das Endvolumen des hinzuzufügenden Basalmediums errechnet, mit dem die oben beschriebenen Zellpellets der beiden unterschiedlichen Spender jeweils resuspendiert und in einem 50-ml-Falconröhrchen schließlich vereinigt werden konnten. Nach der erfolgten Spendervereinigung wurden als T_0-Probe 0,5 bis 1 Mio. Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, mit 700 µl Lysispuffer (RLT-Puffer des Rneasy Mini Kit von Qiagen und 1 % β-Mercaptoethanol) lysiert und bei -80 °C eingefroren. Die Besiedlung der Scaffolds erfolgte, indem 0,5 Mio. der gepoolten Zellen pro Scaffold zugegeben wurden und die 96-Well-Platte 6 h lang in den Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte gestellt wurde, um eine Zelladhäsion an die Scaffolds zu gewährleisten. Nach der Adhärenzzeit wurden die Scaffolds in eine 24-Well-Platte (Low Attachment) überführt. Dabei wurde zunächst die Zellsuspension vorsichtig am Rand des Scaffolds abgezogen und mit einem

sterilen Spachtel und einer Pinzette ebenfalls vorsichtig vom Rand kommend der Scaffold auf die Fläche des Spachtels und von hier aus mit Hilfe der Pinzette auf den Boden des Wells geschoben. Dabei war darauf zu achten, dass die Oberseite der Scaffolds mit den adhärierten Zellen möglichst nicht berührt und die Ober- und Unterseite der Scaffolds beim Überführen nicht vertauscht wurden.
Es wurde jeweils ein Scaffold pro Well überführt, je 1 ml Medium (Basalmedium, CDM oder NH CDM) am Rand des Wells langsam zugegeben und für 2, 4 und 6 Wochen mit pro Zeitpunkt jeweils 3 Medien (s.o.) inkubiert. Für jeden der durchgeführten Versuche erfolgten doppelte Versuchsansätze für die Histologie und Genexpressionsanalyse. Zudem wurde bei jedem Versuch 6 Wochen lang ein unbesiedelter Kontrollscaffold in Basalmedium inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt; bei Bedarf, wenn bei der mikroskopischen Kontrolle abgestorbene Zellen auffielen, auch häufiger. Innerhalb der ersten Woche nach Versuchsbeginn wurden in das CDM täglich 10 ng/ml (1:100) TGF-β3-Aliquots (entsprechen 10 µl/ml Medium aus den TGF-β3- Aliquots von jeweils 100 µl mit einer Konzentration von 1 µg/ml) hinzugefügt. Die gleiche Menge wurde bei jedem Mediumswechsel mit CDM nach dem Auftauen des Mediums frisch zugegeben.
Nach Versuchsende, i.e. nach jedem abgeschlossenen Zeitpunkt (2, 4 und 6 Wochen), wurden die Scaffolds für die Histologie mit PBS gewaschen und mindestens 3 Tage in Formalin eingelegt sowie die RNA-Isolierung inklusive Genexpressionsanalyse durch Lagerung in flüssigem Stickstoff vorbereitet. Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal durchgeführt.

<u>Analysen, die daraus erfolgten</u>

- <u>Histologie:</u>

- Alcianblau-Färbung (pH 1 und pH 2,5)
- Safranin-O-Färbung
- Kollagen-Typ-I- und Kollagen-Typ-II-Färbung (Immunhistologie)

- <u>Genexpression:</u>

- Aggrekan (ACAN)
- Kollagene Typ I, II und X (COL1A1, COL2A1, COL10A1)

Vor den eigentlichen Versuchen wurde ein Probeversuch (V0) gestartet, mit dessen Hilfe die optimale Zellzahl für die zu absolvierenden Versuche bestimmt wurde. Es wurden 3 Scaffolds mit 0,1, 0,5 und 1 Mio. CPC besiedelt. Sie wurden 3 Wochen jeweils in Basalmedium inkubiert. Alles Weitere wurde wie oben bereits beschrieben unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Im Anschluss wurde mittels der Alcianblau- (pH 2,5) und Safranin-O-Färbung das Ergebnis des Versuchs beurteilt und entschieden, dass bei der Besiedelung eine Zellzahl von 0,5 Mio. Zellen/Scaffold erforderlich sei, da hier mikroskopisch betrachtet die meisten Zellen auf den Scaffolds adhärierten und in dessen Matrix migrierten.



Abbildung 5: ***Versuchsaufbau der Besiedlung von pNSC. Das Bild zeigt eine 24-Well-Platte mit typischem Versuchsaufbau. In den beschrifteten Wells befindet sich jeweils ein Scaffold, die alle, Kontrollscaffold ausgenommen, zuvor mit 0,5 Mio. Zellen besiedelt worden sind. 2W.: 2 Wochen; 4W.: 4 Wochen; 6W.: 6 Wochen; BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; K: Kontrollscaffold; pNSC: Porcine nasal septal cartilage.***

2.7.3 Nukleinsäuretechniken

2.7.3.1 RNA-Präparation aus besiedelten Scaffolds

Die mit CPC besiedelten Scaffolds wurden für die RNA-Isolation nach Versuchsende zuerst mit PBS gesäubert und anschließend umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RNA-Isolation wurden sie zuallererst mittels einer Labor-Kugelmühle, dem Mikrodismembranator S, stark zerkleinert und homogenisiert. Die hierfür verwendeten Metallkugeln wurden im Ultraschallbad gereinigt, als Nächstes in flüssigem Stickstoff, der in Dewar-Dewargefäßen aufbewahrt wurde, vorgekühlt und einzeln zu einem Scaffold in einem Kryoröhrchen, ebenfalls in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff, zugegeben und 50 Sekunden bei 3000 rpm pulverisiert bzw. homogenisiert. Nun konnten zu den pulverisierten Scaffolds jeweils 750 µl QIAzol-Lyse-Reagenz hinzugefügt und die Mischung homogenisiert werden. Alle weiteren Schritte der Isolation erfolgten nach den Hersteller-Angaben des Rneasy Lipid Tissue Mini Kits. Die Elution wurde mit 33 µl Rnase-freiem Wasser vorgenommen.

2.7.3.2 Reverse-Transkriptase PCR

2.7.3.2.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese wurde das Omniscript RT Kit verwendet und je 12 µl RNA eingesetzt, um diese in cDNA umzuschreiben. Hierbei wurde die RNA zunächst 5 min lang bei 65 °C denaturiert, mit dem Ziel, die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Nach Ablauf der Zeit wurde sie direkt zum Abkühlen auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu verhindern. Nun folgte die Zugabe von 2 µl 10x Reaktionspuffer, 10 U Ribonuklease Inhibitor, 0,01 µmol dNTP-Mix und 4 U Omniscript Reverse Transkriptase. Die cDNA-Synthese wurde für 60 min bei 37 °C und weitere 60 min bei 42 °C vollendet.

2.7.3.2.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) wurde an einem StepOnePlus™ Real-Time PCR Gerät durchgeführt. Das konstitutiv (grundsätzlich) exprimierte Gen 18S rRNA wurde als endogene Kontrolle verwendet, um die Quantifizierung des Produktes

abgleichen zu können. Die Reaktionsansätze (StepOnePlus: 10 µl) für die qPCR sind unten dargestellt. Es wurden jeweils 2 µl cDNA (zwischen 1:10 und 1:30 für 18S rRNA verdünnt und zwischen 1:2 und 1:4 für alle anderen Gene verdünnt). In Versuch 5 wurden für Col2A1 und COL10A1 3 µl cDNA eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Verdünnungen pro Versuch gleich waren. Die Konzentrationsangaben für die Primer gelten jeweils für den vorwärts- und rückwärts-gerichteten Primer.

Tabelle 4: ***Primer-Endkonzentrationen und MasterMix. Power: Power SYBR® Green PCR Master Mix; Platinum: Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG; TaqMan: TaqMan® Gene Expression Master Mix qPCR SuperMix-UDG; TaqMan: TaqMan® Gene Expression Master Mix; 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; ACAN: Aggrekan; COL1A1: Kollagen Typ I; COL2A1: Kollagen Typ II; COL10A1: Kollagen Typ X.***

Primer	**Primer – Endkonzentrationen**	**MasterMix (1x - Endkonzentration)**
18S rRNA	1,0 µM	Power
ACAN	Sonde	TaqMan
COL1A1	1,0 µM	Platinum
COL2A1	Sonde	TaqMan
COL10A1	Sonde	TaqMan

Folgende Bedingungen wurden für die Amplifikation angewandt:

Zyklenzahl	**Zeit**	**Temperatur**
1	2 min	50 °C
1	10 min	95 °C
40	15 sec	95 °C
	1 min	60 °C
1	20 min	72 °C

Die Schmelztemperatur wurde für die Genexpression von 18S rRNA und COL1A1 bestimmt, da der SYBR green I-Farbstoff unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Produkte bindet. Die Schmelzpunktanalyse dient daher der Identifizierung des Produkts. Je nach GC-Gehalt und größenabhängig besitzt jedes Produkt

einen definierten Schmelzpunkt. PCR-Beiprodukte weisen eine davon abweichende Schmelztemperatur auf. Es wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt und die Genexpressionsstärken der jeweiligen Proben anhand der $\Delta\Delta C_t$-Methode bestimmt. Dazu wurden die Expressionsdaten der Zielgene zunächst auf die Messwerte des „Housekeeping“ Gens 18S rRNA durch Substraktion des Ct-Werts der endogenen Kontrolle vom Ct-Wert des Zielgens bezogen. Durch diese dem ΔC_t-Wert entsprechende Normierung wurden die unterschiedlichen cDNA-Anfangskonzentrationen zwischen den Proben nivelliert. Um das Verhältnis einer Probe zur jeweiligen Kontrolle zu erhalten, wurden zuerst die ΔCt-Werte voneinander abgezogen = $\Delta\Delta C_t$. Durch die Formel $RQ=2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ wurde die sog. Ratio berechnet, dessen Wert der Expressionsstärke des Zielgens relativ der Kontrolle entspricht.

2.7.4 Histologische Methoden

Hinweis: Für die im CDM inkubierten Scaffolds gibt es insgesamt je 3, das BM und NH je 4 Versuche für die Histologie.

2.7.4.1 Silanisieren von Objektträgern

Das Silanisieren von Objektträgern dient in erster Linie der Optimierung der Haftung von Gewebeschnitten auf dem Objektträger. Hierbei ließ man zunächst eine 10 %-ige Extranlösung, wobei 100 ml Extran mit 900 ml Aqua dest. verrührt wurden und über Nacht auf die gewünschte Anzahl der zu silanisierenden Objektträger in einer großen Küvette einwirkten. Am darauffolgenden Tag wurde die Küvette mit den Objektträgern ca. 5 min unter fließendem Leitungswasser abgespült, anschließend für 5 min unter dem Abzug in Aceton und des Weiteren für weitere 5 min in 2 %-ige Aminopropyltriethoxylane-Aceton-Lösung gestellt, wobei 245 ml Aceton mit 5 ml Aminopropyltriethoxylane vermischt wurden. Als Nächstes wurden die Objektträger zweimal kurz in Aceton und dann zweimal kurz in Aqua dest. gespült. Im Anschluss daran wurden diese mit einem Tuch bedeckt luftgetrocknet und bei ca. 40 °C über Nacht im Brutschrank aufbewahrt, um sie dann schließlich staubfrei aufzubewahren.

2.7.4.2 Paraffineinbettung

Um neben der Genexpression auch histologisch durch die CPC gebildete Matrixkomponenten sichtbar zu machen, wurden die besiedelten und kultivierten Scaffolds in Formalin nach Lillie (s. 2.6.4) fixiert. Als Nächstes wurden die Scaffolds mittels der Histokinette dehydriert und im Anschluss an einer Ausgießstation in Paraffin eingebettet. An einem Mikrotom wurden 3,5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die anschließend auf Objektträger gebracht wurden.

2.7.4.3 Alcianblau-Färbungen (pH 1, pH 2,5)

Bei der Alcianblau-Färbung (pH 1) werden sulfatierte Mukosubstanzen leuchtend blau und Kerne rot angefärbt. Hinweis: Für die im CDM inkubierten Scaffolds gibt es insgesamt 3, das BM und NH 4 durchgeführte Versuche für die Histologie.

Als Erstes wurden die Gewebeschnitte auf den Objekträgern ca. eine Stunde bei ca. 65 °C im Brutschrank entparaffiniert, bevor die Schnitte anschließend zur Entwässerung in absteigender Alkoholreihe von je zwei Küvetten Xylol, über 100 %, 96 %, 75% Alkohol bis Aqua dest. nacheinander jeweils in der ersten Küvette kurz geschwenkt und in der zweiten für 5 min stehen gelassen wurden. Nun wurden die Schnitte 10 min lang in 0,1 N Salzsäure eingestellt, anschließend für 30 min in 1 % Alcianblau in 0,1 N Salzsäure bei einem pH von 1 gefärbt, in ebenfalls 0,1 N Salzsäure differenziert und 5 min lang in Aqua dest. gestellt. Daraufhin folgte die 7-minütige Färbung in Kernechtrot in Aluminiumsulfat und das Abspülen der Farbreste in Aqua dest. Zuletzt wurden die Schnitte nochmals, diesmal jedoch in aufsteigender Konzentration mit Alkohol durchtränkt. Auch hier wurden beim 75 %-, 96 %-, 100 %-igem Alkohol sowie Xylol wieder je zwei Küvetten gebraucht, wobei die Objektträger in der jeweils ersten geschwenkt und in der zweiten für 5 min stehen gelassen wurden. Dies bewirkt eine Verdrängung der wässrigen Fixierlösung sowie des Gewebswassers. Die gefärbten Schnitte wurden nun mittels 1-2 Tropfen Eukitt und einem Deckglas eingedeckt und ca. eine Stunde luftgetrocknet, bevor die staubfreie Aufbewahrung folgte. Es wurde pro Färbung eine Positiv-Kontrolle (humanes, fetales Kniegelenk) mitgefärbt.

Bei der Alcianblaufärbung mit pH 2,5 färben sich die Karboxyl- und Sulfatgruppen, i.e. sauer Mukosubastanzen leuchtend blau an sowie Kerne rot. Sie unterscheidet

sich im Wesentlichen lediglich in drei Schritten von der oben beschriebenen Färbung (pH 1): Nachdem die Entwässerung in der absteigenden Alkoholreihe abgeschlossen war und die Schnitte 5 min in Aqua dest. belassen worden waren, wurden die Schnitte anstelle von 10 min in 0,1 N Salzsäure in 3 %-ige Essigsäure eingestellt, ebenfalls 30 min lang in 1 % Alcianblau, jedoch in 3 %-iger Essigsäure bei einem pH von 2,5 gefärbt und anschließend in 3 %-iger Essigsäure differenziert.

2.7.4.4 Immunhistologie von Kollagen-Typ-I-, -II- und -X

Hinweis: Für die im CDM inkubierten Scaffolds gibt es insgesamt 3, das BM und NH 4 durchgeführte Versuche für die Histologie. Die drei Färbungen werden prinzipiell gleich durchgeführt. Die Kollagen-Typ-X-Färbung unterscheidet sich von den beiden anderen, indem zwischem dem Schritt des Entparaffinierens inkl. des Xylols, der absteigenden Alkoholreihe bis 75 % sowie dem Spülen in Aqua dest. und der Einwirkzeit des Pepsins (s. u.) ein 30-minütiges Ruhen in Hyaluronidase 2 mg/mL mit PBS bei pH 5 und 37 °C folgt, um anschließend mit dem Pepsin fortzufahren. Zudem unterscheiden sich alle Färbungen in dem Schritt, bei dem der Primär-Antikörper (entweder gegen Kollagen I, II oder X) auf die Objektträger mit den Scaffold-Schnitten gegeben wird und jener, bei dem die Schnitte in Pepsin gestellt werden. An dieser Stelle unterscheidet sich der Schritt in der zeitlichen Dauer (s. u.).

Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden als Erstes ca. eine Stunde lang bei ca. 65 °C entparaffiniert und im Anschluss für zweimal 10 min in je eine Küvette mit Xylol gestellt, wobei darauf geachtet wurde, die erste Küvette mit Xylol vor dem Gebrauch ebenfalls bei 65 °C warmzustellen, um eine möglichst vollständige Paraffinablösung aus den Schnitten zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe vom 100 %- igen über den 96 %-igen bis zum 75 %-igen Alkohol und zum Schluss in Aqua dest. in je zwei Küvetten eingetaucht. Sie wurden dabei jeweils in der ersten Küvette kurz geschwenkt und in der zweiten für 5 min stehen gelassen. Nun wurden die Schnitte für entweder 2 h (Kollagen-Typ-I-Färbung), 1 h (Kollagen-Typ-X-Färbung) oder lediglich 40 min (Kollagen-Typ-II-Färbung) in 1 mg/ml Pepsin in das 37 °C

warme Wasserbad gestellt. Zur Vorbereitung dieses Schrittes wurde zunächst 0,5 M Essigsäure im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt, parallel hierzu 60 mg Pepsin für 60 ml Gesamtvolumen abgewogen, 60 ml 0,5 M Essigsäure mit Hilfe einer Pipette abgezogen und in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Zu der Essigsäure wurden nun die 60 mg Pepsin hinzugefügt, mit einem Magneten auf einem Magnetrührer so lange verrührt, bis dieses in der Essigsäure gelöst war, schließlich in eine leere Küvette gegeben und für die vorgegebene Zeitdauer (2 h, 1 h oder 40 min (s.o.)) in das 37 °C Wasserbad gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Präparate jeweils erst in PBS und Aqua dest. gespült, bevor sie dann 30 min lang in 3 %-iges Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gestellt wurden. Anschließend wurden die Schnitte erst in Aqua dest. und dann in PBS gespült, sodass darauffolgend je 3-4 Tropfen Protein Block (DAKO) auf die Schnitte gegeben werden konnten. Nach der 30-minütigen Einwirkzeit wurde der Protein Block von jedem Präparat abgegossen und 50 µl auf die Scaffold-Schnitte bzw. 100 µl wegen der größeren Fläche auf die Kontroll-Schnitte des fetalen Kniegelenks des jeweiligen Primär- Antikörpers (Kollagene Typ I, II oder X) auf jeden Schnitt pipettiert. 10 µl des Kollagen-Typ-I- bzw. -II-Antikörpers wurden hierfür zuvor mit dem Antibody Diluent (990 µl) 1:100 bzw. 100 µl des Kollagen-Typ-X-Antikörpers mit 900 µl Antibody Diluent verdünnt. Die Präparate wurden nun 16 h über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden diese zweimal in je einer Küvette mit PBS gespült und schließlich 10 min in PBS mit Brij gestellt, woraufhin eine 30-minütige Einwirkzeit mit je 3-4 Tropfen mit dem Brücken-Antikörper (Biotinylated Link) pro Schnitt folgte. Nun wurden die Schnitte wieder, wie oben bereits beschrieben, zweimal in PBS gespült und 10 min in PBS und Brij gestellt, sodass darauf wiederum eine 30-minütige Einwirkzeit mit je 3-4 Tropfen Streptavidin folgte. Die Reste des Streptavidins wurden nun wieder mit PBS abgespült und die Objektträger in PBS und Brij hineingestellt. Nun folgten 10-20 min Einwirkzeit mit AEC Chromogen, wobei hierbei besonders auf die Positivkontrolle zu achten war. Sobald bei dieser eine Färbung sichtbar wurde, wurde das AEC Chromogen von allen Präparaten erst mit PBS und dann mittels Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Schnitte 5 min lang in Hämatoxylin nach Mayer angefärbt, daraufhin zweimal in Aqua dest. abgespült, in

der zweiten Küvette ein paar Minuten stehen gelassen und mindestens 10 min in Leitungswasser gebläut. Danach wurden sie wieder in eine Küvette mit Aqua dest. gestellt und schließlich in Glycerin-Gelatin, die zuvor bei 65 °C verflüssigt wurde, eingedeckt.

Für jede Färbung wurden 4 Kontrollen eingesetzt: Je eine Positiv- sowie Negativ-Kontrolle pro Scaffold und humanes, fetales Kniegelenk. Auf die Negativ-Kontrollen wurde anstelle des Antikörpers PBS pipettiert; auf die Positiv-Kontrollen (humanes fetales Kniegelenk) wurde wie bei den übrigen Schnitten der jeweilige Antikörper pipettiert.

2.7.4.5 Safranin-O-Färbung

Die Safranin-O-Färbung färbt Zellkerne schwarz, Zytoplasma grau-grün, Schleim, Knorpel je nach Proteoglykangehalt und Mastzellgranula jeweils orange-rot.

Wie in den oben beschriebenen Färbungen bereits aufgeführt, erfolgte zunächst eine ca. 60-minütige Entparaffinierung der Schnitte bei 65 °C. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol und absteigender Alkoholreihe bis zum 96 %-igem Alkohol entwässert. Nun wurden die Schnitte 6-8 min lang in Weigerts saurem Eisenhämatoxylin gefärbt, zweimal in Aqua dest. gespült, 10 min in Leitungswasser gebläut und im Anschluss daran wieder in Aqua dest. gespült. Es folgte eine 3-minütige Färbung in 1:5000 verdünntem wässrigen Fastgreen, das zuvor mit 1-2 Tropfen 100 %-iger Essigsäure angesäuert worden war, und das Spülen der Schnitte in 1 %-iger Essigsäure, bevor sich eine 4-6-minütige Färbung in 0,1 %-igem Safranin-O anschloss. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend bei 96 %-igem über 100 %-igen Alkohol und schließlich übergehend zu Xylol, in das die Schnitte noch 5 min lang gestellt wurden, konnten die Präparate in Eukitt eingedeckt werden.

Pro Färbung wurde eine Positiv-Kontrolle (humanes fetales Kniegelenk) mitgefärbt.

2.7.5 Messungen der Zellschichtbildung und Einwanderungstiefe der CPC

Anhand der erfolgten Gewebeschnitte und der Immunhistologie-Färbung gegen Kollagen Typ I wurden für jeden Versuchsdurchlauf nachträglich die Zellschichtdicke sowie die Einwanderungstiefe der CPC der jeweils 3 unterschiedlichen Medien und Zeitpunkte gemessen. Dies wurde mithilfe des Programms AxioVision durchgeführt. Ziel war es, die oben genannten Zielgrößen quantitativ besser erfassen zu können. Dabei wurde jedesmal wie folgt vorgegangen: Über die Länge/Breite des Scaffolds verteilt, wurden jeweils links-, dann mittig und rechtsseitig die Zellschichtdicke und Einwanderungstiefe anhand von jeweils 3 Werten pro Präparat abgemessen und aus den zugehörigen Werten die Mittelwerte für die einzelnen Medien und Zeitpunkte errechnet.

2.8 Statistik

Zur Veranschaulichung weniger Ausprägungen (bis ca. 15) wurde das Säulendiagramm verwendet. Die Gruppengrößen, die den Analysen zugrunde liegen, variieren jeweils zwischen 3-5. In der sog. Säule selbst sind jeweils die ermittelten Durchschnittswerte aufgetragen. Die Abweichungen des jeweiligen Durchschnittswertes sind als Standardabweichung (SD) im Fehlerbalken festgehalten. Die Standardabweichung σ ist das Maß für die Streubreite der Werte eines Merkmals rund um dessen Mittelwert und wird auch als arithmetisches Mittel bezeichnet, wobei X dem Probenmittelwert und n dem Probenumfang entspricht.

$$\sigma(X) = \sqrt{Var(X)} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{(n-1)}}$$

Zur Ermittlung signifikanter Abweichungen von Mittelwerten verschiedener Gruppen mit differenten Versuchsbedingungen erfolgte die Anwendung der zweifaktoriellen Varianzanalyse (2-way-ANOVA). Um die verschiedenen Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Bonferroni post-hoc Test eingesetzt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant (*), ein p-Wert < 0,01 wurde als hochsignifikant (**), ein p-Wert ≤ 0,001 wurde als höchstsignifikant (***) bezeichnet.

3 Resultate

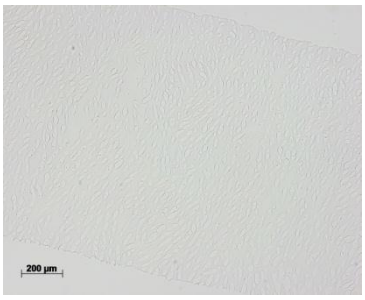
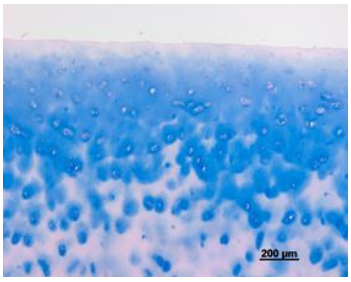
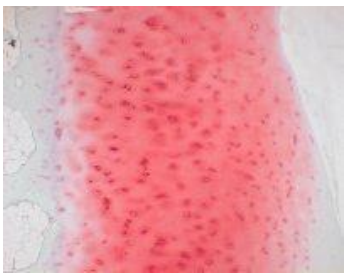
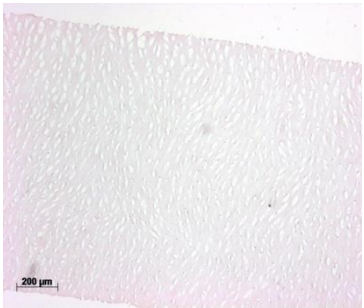
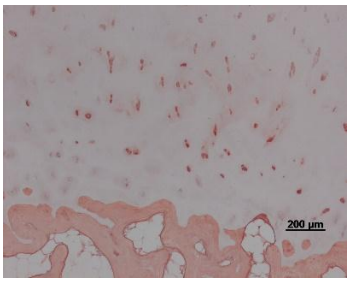
Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein neues Biomaterial bestehend aus Kollagen Typ II aus Schweinenasensepten (pNSC-Scaffolds) getestet, das möglicherweise als Ersatzmaterial bei der Behandlung von Knorpeldefekten geeignet ist. Neue Studien zeigen, dass im Knorpel eine Population von chondrogenen Progenitorzellen (CPC) vorhanden ist, die migratorisch aktiv ist. Diese CPC könnten eine mögliche Zielpopulation für die *In-situ*-Knorpelregeneration darstellen. Ziel eines regenerativen Therapieansatzes bei Knorpeldefekten ist es, den Defekt langfristig mit einer Matrix aufzufüllen, die knorpeltypische Eigenschaften bzgl. der Zusammensetzung und Biomechanik aufweist. Deshalb wurde die Bildung von Matrixkomponenten als Maß für Differenzierungsverhalten der CPC in pNSC, deren Adhäsions- und Migrationsverhalten sowie biomechanische Eigenschaften der besiedelten Matrizes untersucht.

3.1 Expression von Matrixkomponenten in besiedelten pNSC-Scaffolds

Um das Differenzierungsverhalten von CPC bzgl. der Matrixsynthese nach einer Besiedlung der pNSC-Scaffolds beurteilen zu können, wurde histologisch bzw. immunhistologisch (s. u. 3.1.1-4) und auf Ebene der Genexpression untersucht welche Matrixkomponenten gebildet wurden. In die Analyse wurde der Nachweis von Proteoglykanen (GAGs und Aggrekan) und Kollagen Typ II als typische Komponenten des Knorpels eingeschlossen. Desweiteren wurde die Expression von Kollagen Typ I und X zur Visualisierung der Zellen in der Matrix bzw. zur Beurteilung des Differenzierungsstatus analysiert. Zunächst wurde untersucht, ob die aufgeführten Matrixkomponenten bereits in unbesiedelter pNSC-Matrix nachzuweisen sind. Abbildung 6 (s. u.) zeigt, dass weder Proteoglykane noch Kollagen Typ I oder X in unbesiedelten Scaffolds nachweisbar sind. Dagegen zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Färbung von Kollagen Typ II.

Die Kontrollen aller Färbungen geben einen Überblick darüber, wie sich die unbesiedelten pNSC-Scaffolds in den jeweiligen Färbungen präsentieren.

Zusätzlich werden auch die Positivkontrollen von fetalen bzw. adulten Kniegelenken gezeigt:

Färbung	**Unbesiedelter pNSC-Scaffold** **jew. 5x-Vergrößerung**	**Positiv-Kontrolle:** **Humanes adultes Knie- (K) bzw. Hüftgelenk (H),** **jew. 5x-Vergrößerung**
Alcianblau pH 1		
Alcianblau pH 2,5		 (H)
Safranin-O		 (K)
Immunhistologie Kollagen Typ I, Positiv-Kontrollen		 (H)

Fortsetzung von Abbildung 6 auf Seite 50

Fortsetzung von Abbildung 6 von Seite 49

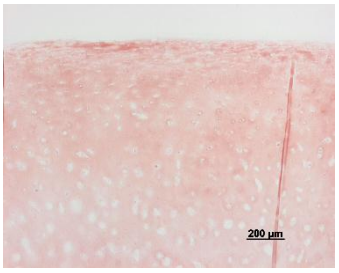
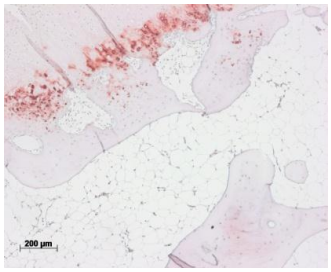
Färbung	**Unbesiedelter pNSC-Scaffold** **jew. 5x-Vergrößerung**	**Positiv-Kontrolle:** **Humanes adultes Knie- (K) bzw. Hüftgelenk (H),** **jew. 5x-Vergrößerung**
Immunhistologie Kollagen Typ II		 (K)
Immunhistologie Kollagen Typ X		 (K)

Abbildung 6: ***Kontrollen aller Färbungen. In der linken Spalte sind jeweils die Namen der Färbungen aufgetragen, mittig befinden sich die gefärbten Paraffinschnitte der unbesiedelten pNSC-Scaffolds, rechtsseitig die Positivkontrollen von Kniegelenken. Längenstandard: 200 µm. Je 5x-Vergrößerung. PNSC: Porcine nasal septal cartilage.***

3.1.1 Proteoglykane

Die Anwesenheit großer Mengen von Proteoglykanen ist allgemein ein Charakteristikum für hyalinen Knorpel und speziell für Gelenkknorpel (Buckwalter et al. 1994, Dudhia 2005, Hardingham & Fosang 1992, Fosang et al. 1992). Aggrekan stellt hierbei das wichtigste Proteoglykan im Knorpel dar. Aggrekan enthält zahlreiche GAG-Seitenketten. Diese sind an das Aggrekan-Cor-Protein gebunden (Lüllmann-Rauch 2006). Deshalb wurde hier mit Hilfe der Alcianblaufärbungen mit pH 1 und 2,5 und zur Bestätigung derselben mittels der Safranin-O-Färbung zum Nachweis von GAGs sowie der Bestimmung der Genexpression von ACAN die Bildung von Proteoglykanen untersucht. Im Allgemeinen werden bei der Alcianblaufärbung mit pH 1 sulfatierte Mukosubstanzen leuchtend blau angefärbt. Bei der Alcianblaufärbung mit pH 2,5 werden saure Mukosubstanzen leuchtend blau (Carboxyl-/Sulfatgruppen) angefärbt (s. jew. 2.7.4.3). Die Safranin-O-Färbung dient u. a. der Färbung von Zellkernen (schwarz), Zytoplasma (grau-grün) und Knorpel (je nach Proteoglykangehalt orange-rot) (s. 2.7.4.5). Mithilfe der quantitativen reversen Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wurde untersucht, inwiefern die hierfür eingesetzten CPC Unterschiede in ihrem Genexpressionsverhalten zu variierenden Bedingungen wie Medien und Zeit aufweisen. Es wurde die Genexpression von ACAN der CPC in besiedelten Scaffolds relativ zur Expression in CPC vor Besiedlung untersucht (T_0-Probe).

Mit Ausnahme der angefärbten Zellkerne war in beiden Alcianblaufärbungen (pH 1 und 2,5) und der Safranin-O-färbung bei den im Basalmedium inkubierten pNSC-Scaffolds ansonsten keine wesentliche Färbung zu keinem der zu beobachtenden Zeitpunkte (2, 4 und 6 Wochen) erkennbar, wie auf den unten dargestellten Bildern zu sehen ist (s. u. Abb. 7-9, A-C). Das bedeutet, dass sich histologisch im Basalmedium keine Proteoglykane nachweisen ließen. Diese Erkenntnis korrelierte nicht mit dem Ergebnis der Genexpression für ACAN, welche im Laufe der Zeit anstieg (verglichen mit T_0-Probe): Nach 6 Wochen ließ sich im Vergleich zum Zeitpunkt nach 2 Wochen ca. eine Verdopplung der Menge des exprimierten ACANs in BM feststellen (Abb. 10). In CDM zeigten sich in der Alcianblaufärbungen (pH 1 und 2,5) und der Safranin-O-Färbung bei den pNSC-

Scaffolds spenderabhängig unterschiedliche histologische Ergebnisse. Tendenziell war für die meisten Spender in den oben genannten Färbungen bei 2 und 4 Wochen keine bzw. nach 6 Wochen eine geringe Anfärbung erreicht worden. Somit waren bei insgesamt 3 Versuchen zweimal kaum Proteoglykane nachweisbar (s. u. Abb. 7-9, D-F). Allerdings war die Färbung in der Alcianblaufärbung pH 2,5 nach 6 Wochen etwas deutlicher ausgeprägt als bei pH 1, sodass geringgradig mehr saure (Carboxyl-/Sulfatgruppen) als lediglich sulfatierte Mukosubstanzen vorhanden zu sein schienen (Abb. 7, F vs. Abb. 8, F). Jedoch konnte bei Verwendung von CPC eines anderen Spenders eine deutliche Färbung von Proteoglykanen nachgewiesen werden (s. u. Abb. 11). Dies zeigte sich sowohl in den Alcianblaufärbungen, als auch in der Safranin-O-Färbung, wie in Abb. 11 zusammenfassend dargestellt ist. In der Alcianblaufärbung ist eine kräftige Blaufärbung in der Zellschicht erkennbar, die der Zelleinwanderung folgend auf den Scaffold-Rand überging und somit nicht alleine auf die Zellschicht begrenzt blieb (Abb. 11, A, B). Außerdem fiel auf, dass in der vermutlich vor der Besiedlung vorhandenen Pore im Scaffold die Zelleinwanderung bis an die Unterseite des Scaffolds erfolgte und auch hier eine gut sichtbare Blaufärbung vorhanden war. Parallel war in der Safranin-O-Färbung nach 6 Wochen eine großflächige, leuchtende Orangefärbung erkennbar, die die erfolgte Proteoglykansynthese nachwies. Bemerkenswert war die in der Pore etwas deutlicher hervortretende Orange-/Violettfärbung als im übrigen Scaffold (Abb. 11, C). Auf Ebene der Genexpression blieb die Expression von ACAN jedoch zu allen Zeitpunkten verglichen mit T_0 auf konstant niedrigem Niveau (kleiner Fehlerbalken). Der Zeitpunkt nach 6 Wochen zeigte zwischen CDM und NH (durchschnittlicher RQ-Wert ca. 1 vs. 16) einen hochsignifikanten mRNA-Expressionsunterschied (Abb. 10). Bei den pNSC-Scaffolds im NH-Medium zeigten sich im Laufe der Kultivierung versuchsabhängig variable, aber gleichzeitig jeweils deutliche Veränderungen der Scaffolds, die sich in verschieden starker Ausprägung der Anfärbung zeigten. Hier schienen die Zellen, verglichen mit dem Basalmedium und CDM, am meisten zu proliferieren und in der Lage zu sein, eine proteoglykanhaltige Matrix zu bilden. Nach 2 Wochen ließ sich in den Alcianblaufärbungen innerhalb der Zellschicht eine leichte, aber deutlich sichtbare

Blaufärbung erkennen, die ebenfalls durch in die Lakunen einwandernde Zellen bereits auf den Scaffold überging (s. u. Abb. 7, G; Abb. 8, G), in der Safranin-O-Färbung war nach 2 Wochen hingegen (noch) keine auffällige Färbung sichtbar (s. u. Abb. 9, G). Nach 4 Wochen hatte sich mit zunehmender Zelldichte auch die Blaufärbung sowohl in der Zellschicht, als auch den einwandernden Zellen folgend auf weite Teile des Scaffolds ausgedehnt (s. u. Abb. 7, H; Abb. 8, H). Innerhalb von 6 Wochen bildete sich in den Alcianblaufärbungen, bedingt durch die räumliche Ausdehnung der Zellen auf den Scaffold, eine intensive, leuchtende Blaufärbung aus (s. u. Abb. 7, I; Abb. 8, I) - in der Safranin-O-Färbung war nach 4 Wochen bereits eine Aufhellung des Grüns sichtbar (s. u. Abb. 9, H), die sich nach 6 Wochen in einer starken Orange-Färbung hervorhob (s. u. Abb. 9, I). Somit wurde deutlich, dass sich histologisch in NH-Medium kultivierten, CPC-besiedelten Scaffolds Proteoglykane nachweisen ließen. Besonders ausgeprägt fand in den pNSC-Scaffolds des NH-Mediums entlang der Richtung der Zellmigration, bereits zum frühesten ermittelten Zeitpunkt nach 2 Wochen ausgehend von der Scaffold-Oberfläche, die Bildung kleiner Kanäle statt, entlang derer -neben der in unmittelbarer Zellnähe beschriebenen - die Matrix-Neosynthese v. a. in den pNSC-Scaffolds des NH-Mediums sichtbar wurde (s. u. Abb. 7-9, je G-I).

Um die Verteilung der gebildeten Proteoglykane im Scaffold zu veranschaulichen, werden in Abbildung 12 die verschiedenen Färbungen der besiedelten Scaffolds nach 4 und 6 Wochen Kultivierung in NH-Medium in einer Übersichtsvergrößerung dargestellt (s. u. Abb. 12, A-F). Nach 4 Wochen war in der Übersichtsdarstellung der Alcianblaufärbungen (Abb. 12, A, C) eine den Scaffold umgebende Zellschicht mit Blaufärbung sichtbar, die weiter auf den Scaffold übergegangen war und diesen großflächig eingenommen hatte. In Bild C enthält allein die Mitte des Scaffolds noch Aussparungen einer Färbung. Nach 6 Wochen (Abb. 12, B, D) war in der Übersicht erkennbar, dass die Färbung innerhalb des Scaffolds deutlich ausgeprägter war als in der Zellschicht und die Färbung den gesamten Scaffold eingenommen hatte, während die Grenze zwischen Zellschicht und Scaffold verschwommen war. Die oben erwähnte Aufhellung in der Safranin-O-Färbung im NH-Medium nach 4 Wochen (s. u. Abb. 9, H) ist in Abb. 12, E erkennbar, insbesondere am oberen Scaffoldrand im Übergang von der Zellschicht auf den

Scaffold. Zum Zeitpunkt nach 6 Wochen sah man innerhalb des Scaffolds eine weitflächige Orangefärbung, die die erfolgte Proteoglykanbildung bestätigte, welche inmitten der Zellschicht in deren unteren Hälfte weniger intensiv ausfiel. An Orten größerer Zellansammlung resultierte tendenziell eine stärkere Orangefärbung (Abb. 12, F). Die in der unbesiedelten Kontrolle bestehende Grünfärbung (s.o. Abb. 6, Safranin-O) wurde immer mehr von leichtem Orange/Violett durchsetzt.

In der Genexpression von ACAN bestätigten sich die in der Histologie gewonnenen Eindrücke: Die ACAN-Genexpression war im NH-Medium im Verlauf ansteigend. Hier ließ sich nach 6 Wochen im Vergleich zum Zeitpunkt nach 2 Wochen, ausgehend von einem höheren Niveau im Vergleich zum BM, ungefähr die zweifache Menge an ACAN-mRNA beobachten (Abb. 10).

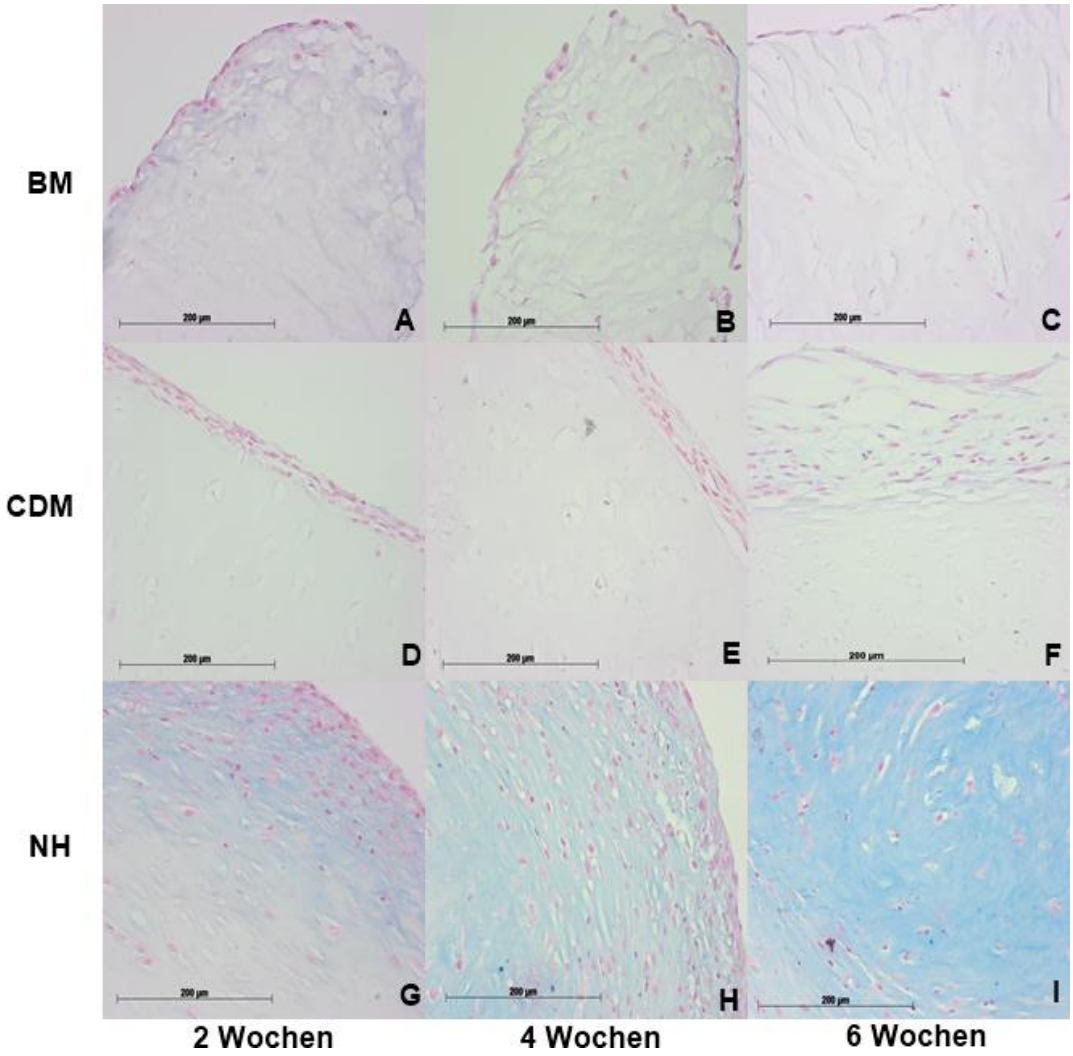


Abbildung 7: ***Alcianblaufärbung pH 1 besiedelter pNSC-Scaffolds. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM bzw. NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A-C), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: D-F) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: G-I) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Je 20x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.***

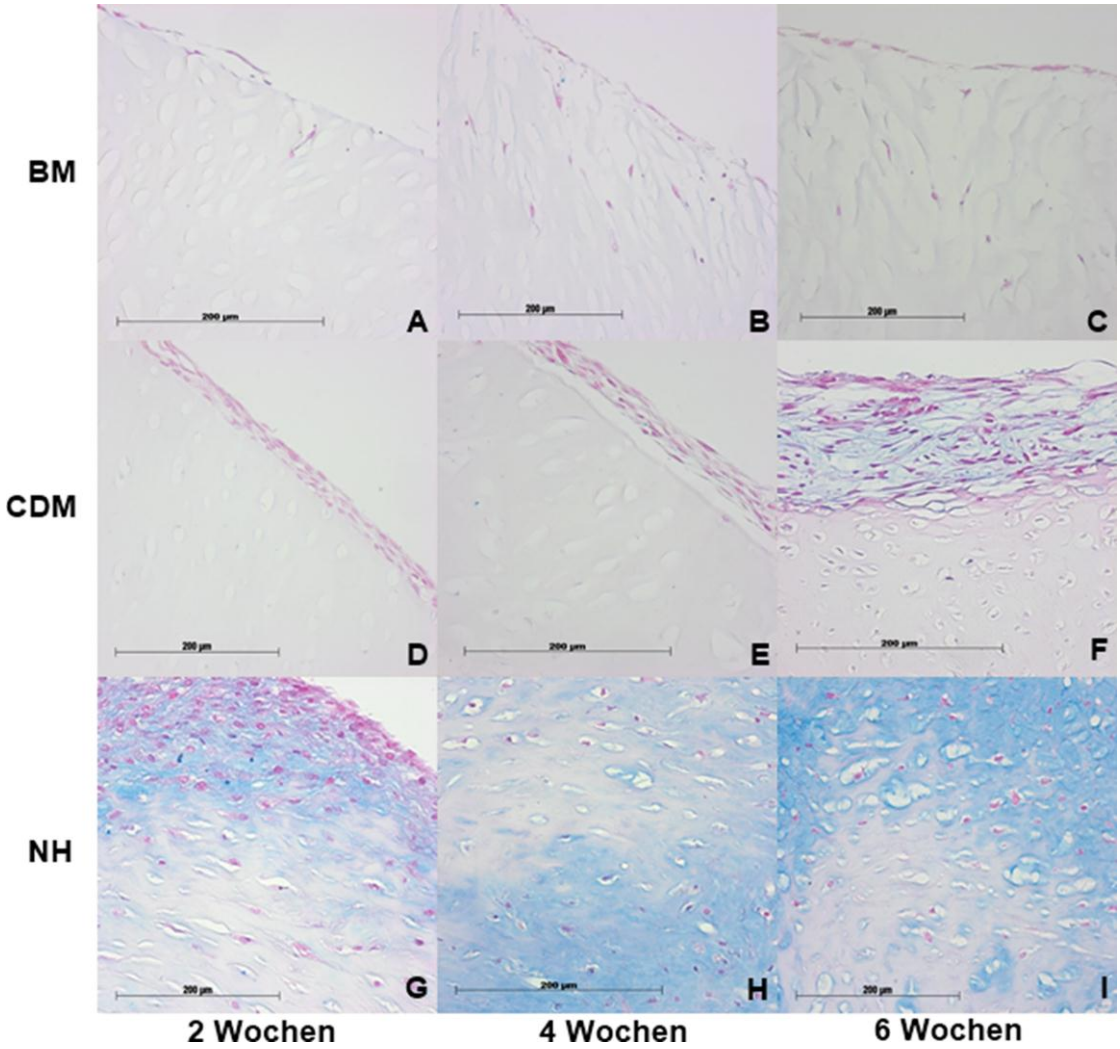


Abbildung 8: ***Alcianblaufärbung pH 2,5 CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM, NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A-C), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: D-F) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: G-I) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Je 20x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.***

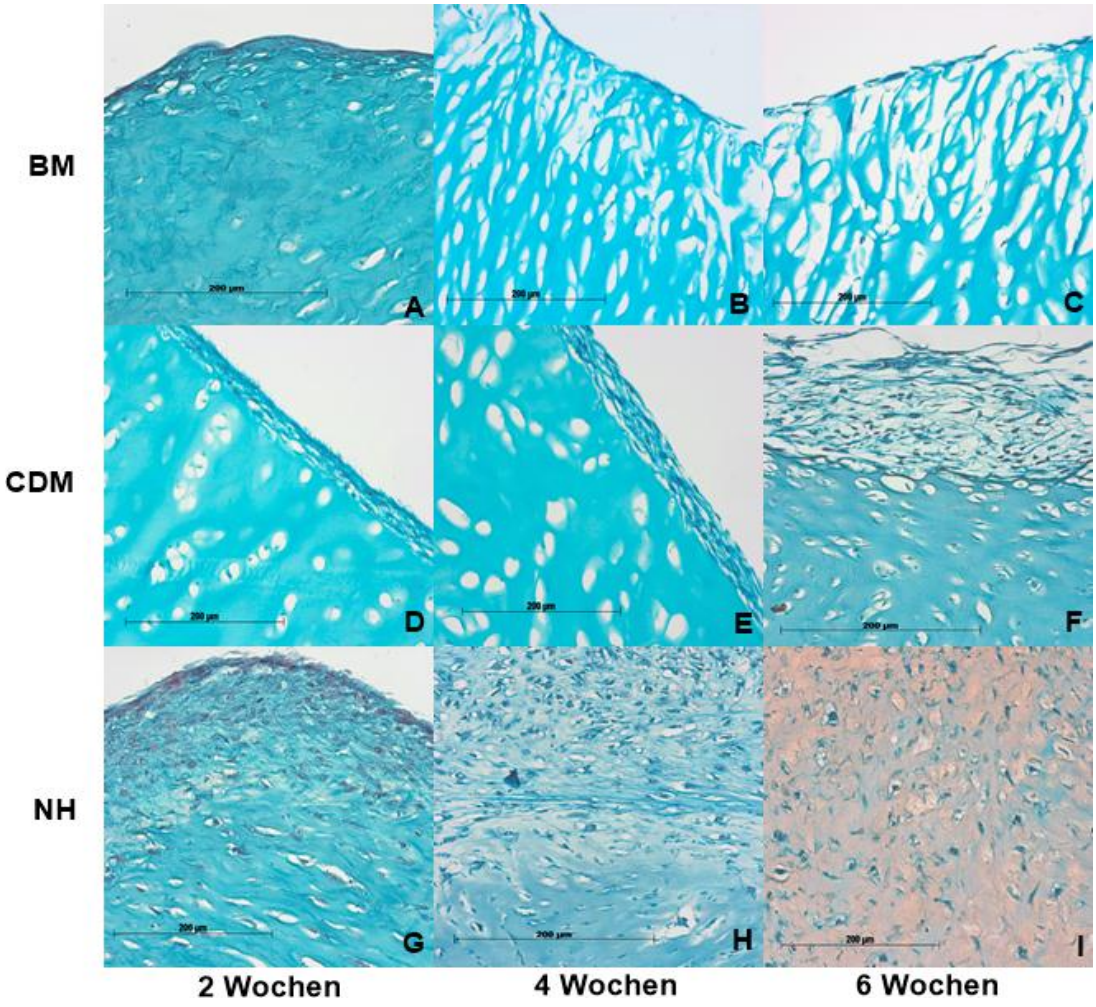


Abbildung 9*: Safranin-O-Färbung CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM bzw. NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A-C), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: D-F) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: G-I) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Je 20x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.*

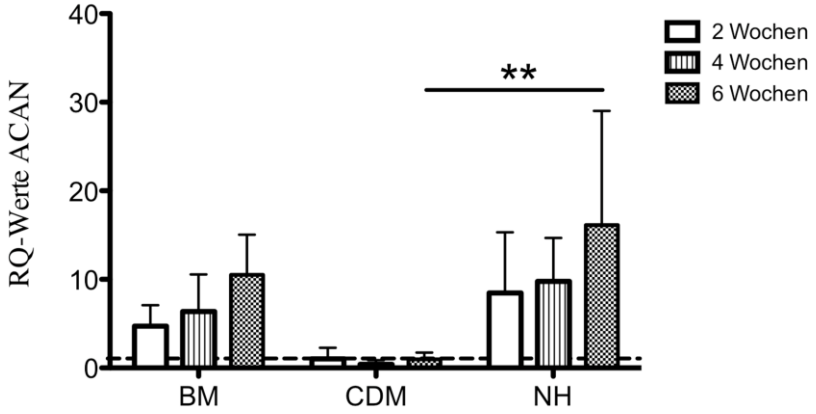


Abbildung 10*: Relative Quantifizierung der ACAN-Genexpression von CPC-besiedelten pNSC-Scaffolds. Die Experimente wurden zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt, für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM, je Zeitpunkt n=5), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM, je Zeitpunkt n=4 oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH, je Zeitpunkt n=5) kultiviert und die Genexpression im Vergleich zu CPC direkt vor der Scaffold-Besiedlung bestimmt. Als endogene Kontrolle diente 18S rRNA. Aufgetragen ist der Mittelwert +/- SD. **: p < 0,01. RQ: Relative Quantifizierung; ACAN: Aggrekan; BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; SD: Standardabweichung (standard deviance).***

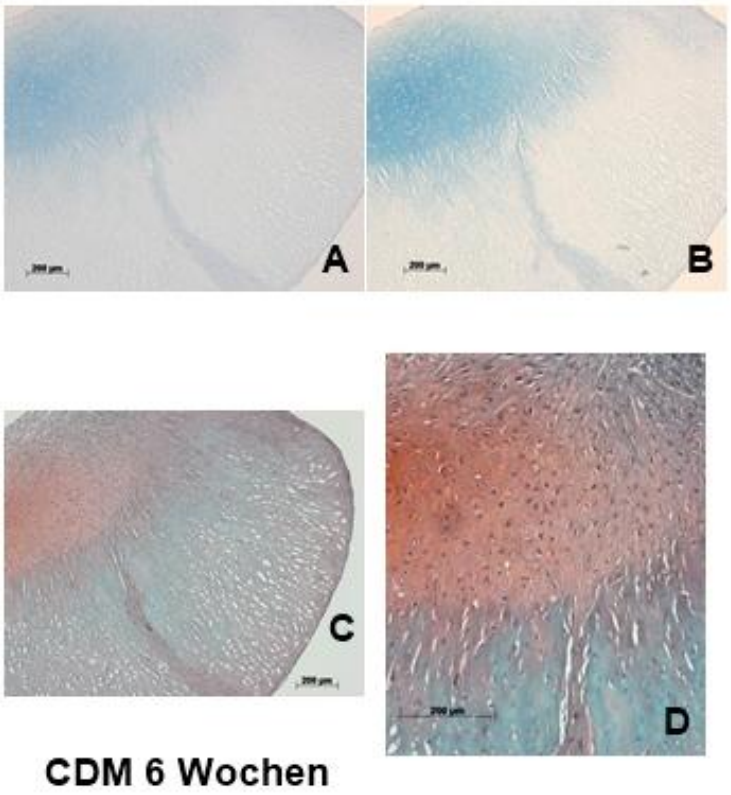


Abbildung 11*: Alcianblaufärbungen (A: pH 1; B: pH 2,5) und Safranin-O-Färbung (C, D) CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds von Spender Nr. 5, bei dem verglichen mit anderen Spendern (s. Abb. 7-9) histologisch in CDM kultivierten pNSC-Scaffolds deutlich mehr Proteoglykane nachweisbar waren. Es wurden Experimente zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 6 Wochen u. a. in chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: A-D) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. A-C: 5x-Vergrößerung; Bild D: 10x-Vergrößerung. CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.***

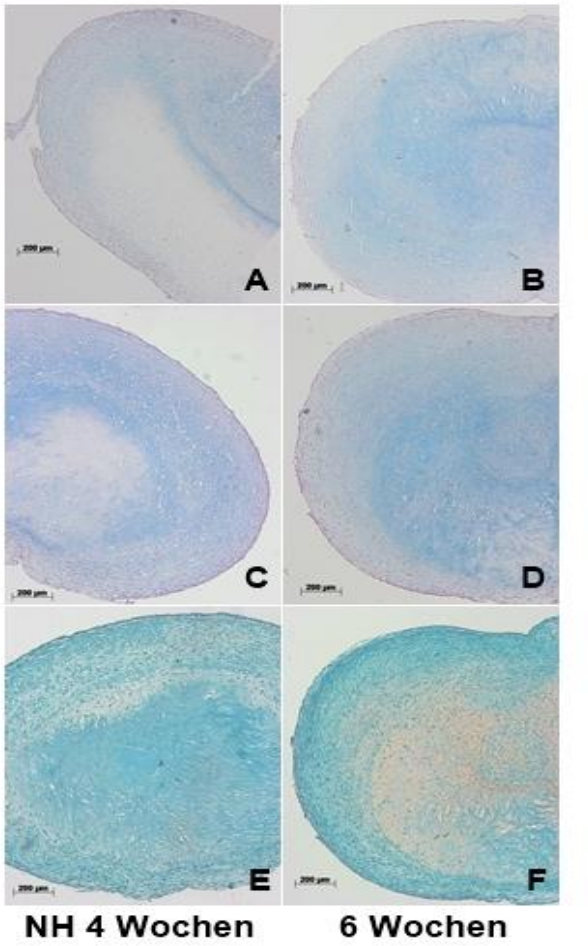


Abbildung 12*: Übersicht Alcianblaufärbungen (A, B: pH 1; C, D: pH 2,5) und Safranin-O-Färbung (E, F) CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds, kultiviert in NH. Bilder A, C, E: nach 4 Wochen; B, D, F: nach 6 Wochen. Es wurden Experimente zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 4 und 6 Wochen u. a. in NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (A-F) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. A-F: 5x-Vergrößerung. NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.*

3.1.2 Kollagen Typ I

Kollagen Typ I (fibrilläres Kollagen) ist der häufigste Kollagentyp (Wachtler 2005) und kommt u. a. im Knochen, in der Dermis, in Sehnen, Bändern, der Sklera, Kornea und im Dentin vor (Lüllmann-Rauch 2006). Zudem ist es in Chondrozyten ein Maß für deren Differenzierungsstatus. In CPC gibt die Menge an Kollagen Typ I einen Hinweis darauf, ob diese dedifferenziert (hohes Level an Kollagen Typ I) oder in die chondrogene Richtung differenziert sind (niedriges Level an Kollagen Typ I) (Schulze-Tanzil et al. 2002). Mit Hilfe der Immunhistologie für Kollagen Typ I sowie der Bestimmung der Genexpression von COL1A1 wurde dessen Bildung ermittelt.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten (2, 4 und 6 Wochen) der Immunhistologie des Kollagen Typ I der im Basalmedium inkubierten pNSC-Scaffolds befand sich in unmittelbarer Umgebung der Zellen eine dunkle Rotfärbung, wodurch sowohl die oberflächliche Zellschicht als auch die einwandernden Zellen deutlich sichtbar sind (s. u. Abb. 13, A-C). Diese ist als erfolgte Bildung von Kollagen Typ I zu bewerten. Wie schon in den vorherigen gezeigten Abbildungen in allen Färbungen des BM sichtbar wurde, gibt es keine wesentlich sichtbare farbliche Variabilität zwischen den Zeitpunkten des BM. Insgesamt ist die mRNA-Expression von COL1A1 der CPC-besiedelten Scaffolds im BM zu allen Zeitpunkten herabreguliert (Ø RQ-Werte jew. < 0,5) (Abb. 14). In der Kollagen-I-Färbung (s. u. Abb. 13, D-F) in den pNSC-Scaffolds des CDM nach 2, 4 und 6 Wochen ist in der Zellschicht eine deutliche Rotfärbung auszumachen, die zum Zeitpunkt nach 2 Wochen im Übergang zwischen der Zellschicht und dem Scaffold (Kollagen I) sichtbar wurde. Die Menge an Kollagen Typ I schien sich im Verlauf der Zeitpunkte bei 2 der 3 histologisch ausgewerteten Versuche der pNSC-Scaffolds des CDM, wie auch schon im Basalmedium (Abb. 13), nicht maßgeblich verändert zu haben. Bei einer Versuchsreihe der CDM-inkubierten besiedelten pNSC (Spender 5) ließen sich deutliche Veränderungen gegenüber den genannten Beobachtungen feststellen: Hier stellte sich u. a. in der Kollagen-I-Färbung im Zeitverlauf eine immer großflächigere Färbung innerhalb der Zellschicht und den zahlreich einwandernden Zellen folgend, und somit auf den Scaffold übergehend, dar (s. u. Abb. 15, A, B). Die Eindrücke aus der Histologie für Kollagen I korrelierten

nicht immer mit den Ergebnissen der Genexpression für COL1A1 (Abb. 14): Erschien die Immunhistologie für Kollagen Typ I im CDM im Zeitverlauf konstant bzw. ansteigend, so zeigte sich hier im Zeitverlauf in der Genexpression bei durchschnittlichen RQ-Werten < 1 insgesamt eine Herabregulation von COL1A1 (Abb. 14).

Mit Fortschreiten der Zeit manifestierte sich in den pNSC-Scaffolds des NH-Mediums in der Kollagen-Typ-I-Färbung inmitten der Zellschicht, in und zwischen den Zell-Lakunen eine flächig immer ausgeprägtere dunkelrote Färbung (Abb. 13, G-I), die sich bereits nach 2 Wochen beobachten ließ. Die Rotfärbung zwischen den Zell-Lakunen sowie innerhalb der Zellschicht dehnte sich im Laufe der Zeit auf eine größere Fläche innerhalb des Scaffolds aus und gab in Abhängigkeit von der Intensität der Färbung einen Anhaltspunkt zur gebildeten Menge an Kollagen I wieder. In den besiedelten pNSC-Scaffolds des NH-Mediums begann die COL1A1-Genexpression auf einem höheren Ausgangslevel als in den anderen beiden Medien und erreichte in der weiteren Kultivierung in etwa das Expressionslevel der Ausgangszellpopulation (Abb. 14). Das Niveau der COL1A1-Genexpression unter NH-Kultivierung hat sich also im Vergleich zum Ausgangszustand der Zellen (T_0-Probe) nicht signifikant verringert, was mit der beobachteten Synthese von Kollagen Typ I in der Immunhistologie korreliert.

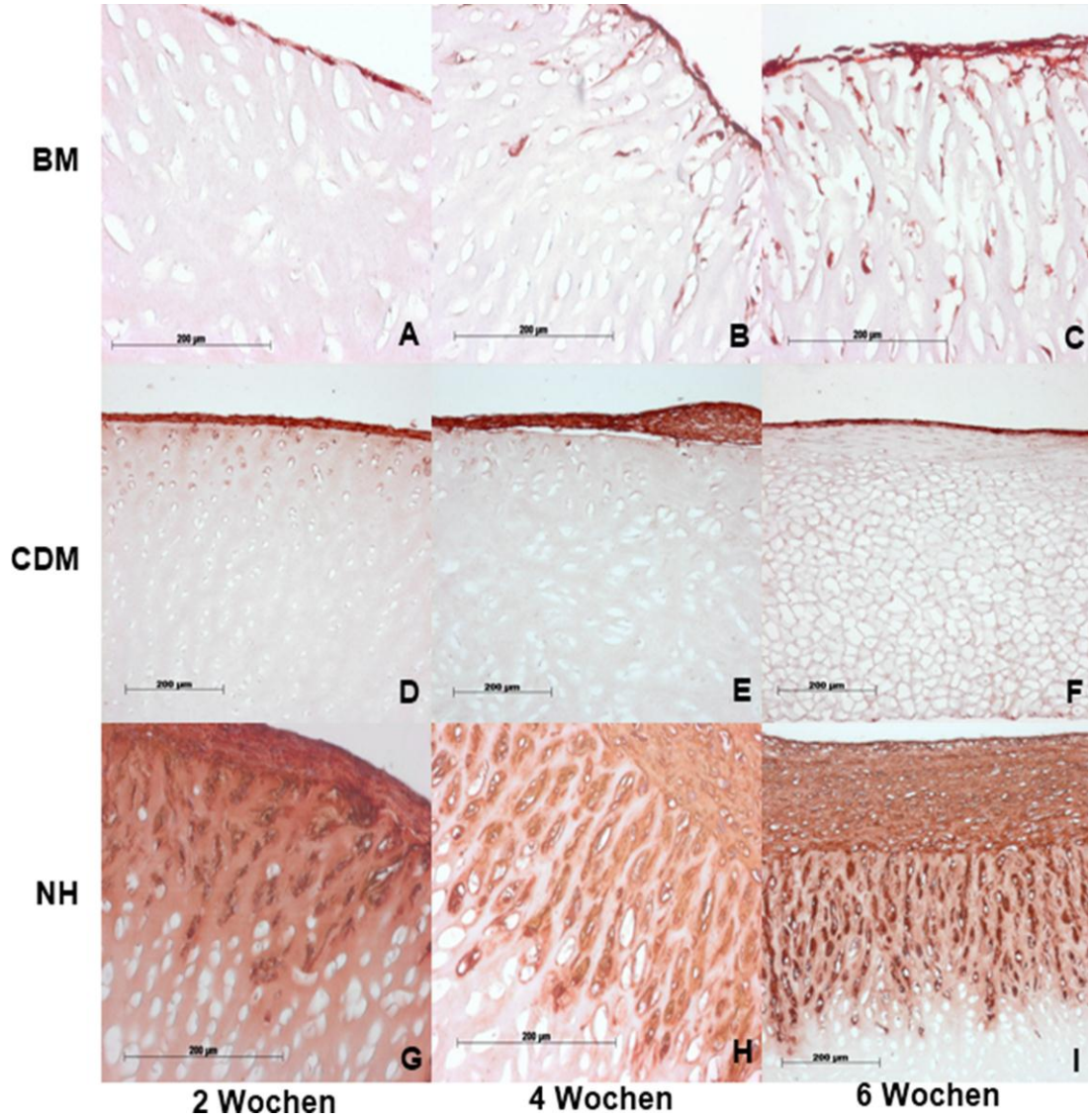


Abbildung 13*: Kollagen-Typ-I-Färbung CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM, NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A-C), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: D-F) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: G-I) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Bilder D-F sowie I je 10x-, Rest 20x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.*

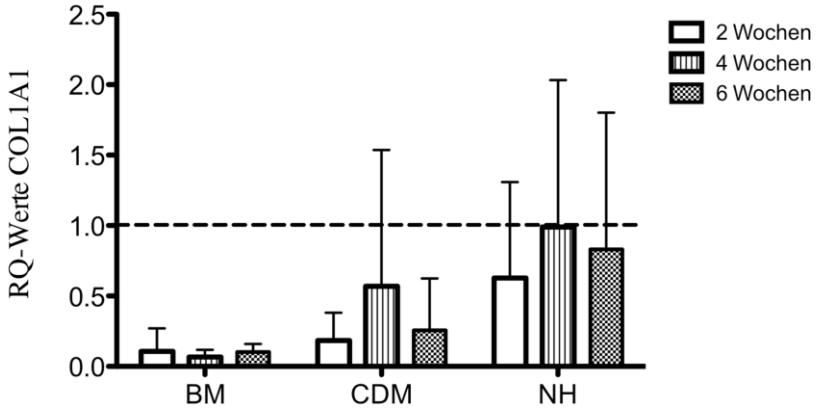


Abbildung 14*: Relative Quantifizierung der COL1A1-Genexpression von CPC-besiedelten pNSC-Scaffolds. Die Experimente wurden zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt, für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM, je Zeitpunkt n=3), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM, je Zeitpunkt n=3 oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH, für Zeitpunkt 2 Wochen n=3; für die Zeitpunkte 4 bzw. 6 Wochen je n=4) kultiviert und die Genexpression im Vergleich zu CPC direkt vor der Scaffold-Besiedlung bestimmt. Als endogene Kontrolle diente 18S rRNA. Aufgetragen ist der Mittelwert +/- SD. RQ: Relative Quantifizierung; COL1A1: Kollagen Typ I; BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; SD: Standardabweichung (standard deviance).***

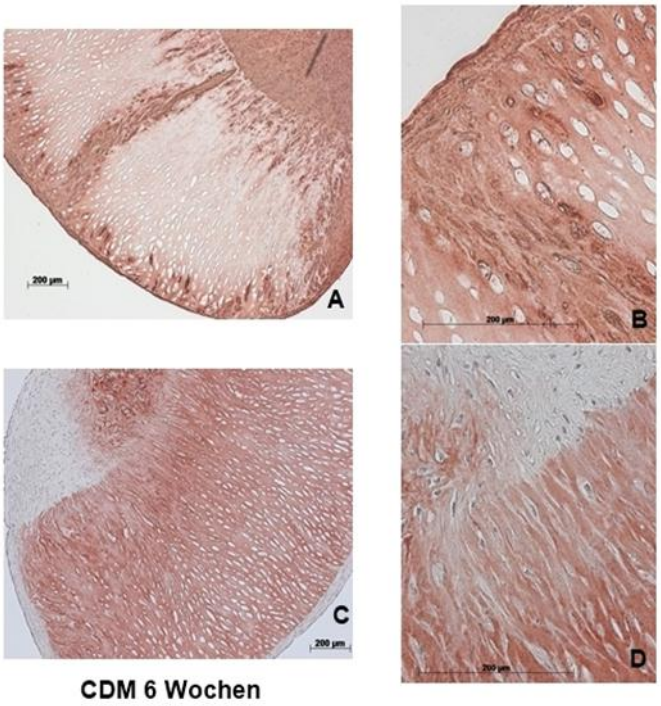


Abbildung 15: ***Immunhistologie für Kollagen Typ I (A, B) sowie Kollagen Typ II (C, D) CPC-besiedelter, in CDM inkubierter pNSC-Scaffolds zum Zeitpunkt nach 6 Wochen. Es wurden Experimente zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und 6 Wochen in Basalmedium (BM), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM) kultiviert. Bei der Verwendung von CPC von Spender 5 wurde ein von den oben und unten gezeigten Färbungen (s.o. Abb. 13 und unten 16, jew. D-F) abweichendes Ergebnis für das CDM beobachtet. Längenstandard: 200 µm. A, C je 5x-, B, D je 20x-Vergrößerung. CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.***

3.1.3 Kollagen Typ II

Kollagen II kommt vor allem im hyalinen Knorpel vor (Lüllmann-Rauch 2006). Mit Hilfe der Immunhistologie für Kollagen Typ II sowie der Bestimmung der Genexpression von COL2A1 wurde dessen Bildung ermittelt.

Eine eindeutige immunhistologische Färbung von Kollagen Typ II konnte in der Zellschicht auf BM-inkubierten pNSC zu keinem der Zeitpunkte nachgewiesen werden. Es war allenfalls eine leichte Rosa-Violett-Färbung in der unmittelbaren Umgebung der Zellen zu erkennen, die zeitabhängig keine wesentliche farbliche Variabilität bot. Hingegen steigerte sich die Genexpression für COL2A1 im BM mit einem Ø RQ-Wert von zunächst ca. 2,78 (gegenüber T_0-Probe), nach 4 Wochen ungefähr 45-fach auf einen RQ-Wert von ca. 126 und nach 6 Wochen verglichen mit dem Ausgangswert ca. 220-fach auf ca. 617 (Abb. 17) und bestätigte somit nicht die Beobachtungen aus der Histologie. Auch in 2 der 3 durchgeführten Versuchsreihen für CDM konnte keine Kollagen-Typ-II-Färbung in der Zellschicht beobachtet werden. Bei einer Versuchsreihe der CDM-inkubierten besiedelten pNSC (Spender 5) jedoch ließen sich deutliche Veränderungen gegenüber den genannten Beobachtungen feststellen: Hier stellte sich in der Kollagen-Typ-II-Färbung im Zeitverlauf eine immer großflächigere Färbung innerhalb der Zellschicht und den zahlreich einwandernden Zellen folgend, und somit auf den Scaffold übergehend, dar (s. u. Abb. 16, C, D). In der Kollagen-Typ-II-Färbung war hier im CDM-Medium bereits ab dem 14. Tag eine leichte und im weiteren Verlauf sehr deutlich zum Vorschein tretende Kollagen-Typ-II-Synthese nachzuweisen. In der Übersichtsdarstellung zeigte die Kollagen-Typ-II-Färbung (Abb. 16, Bild C) innerhalb der dichten Zellschicht nach 6 Wochen Kultivierung in CDM eine wesentliche, großflächige Dunkelrotfärbung, wobei der Rest der Zellschicht sich rosa darstellte. Auch innerhalb des Scaffolds waren weitläufig verschiedene Intensitäten der Rotfärbung erkennbar. In der 20x-Vergrößerung (Abb. 16, Bild D) ließen sich im Übergang der Zellschicht auf den Scaffold unterschiedliche Rottöne erkennen, deren Stärke der Färbung einen Anhaltspunkt für die Menge gebildeten Kollagens, und somit einen Nachweis über die erfolgte Matrixbildung bot (Abb. 17, Bilder A-D). In der immunhistologischen Färbung für Kollagen Typ II war innerhalb des Scaffolds die Unterscheidung zwischen Kollagen-Typ-II-Neusynthese und

bereits vorher vorhandenen Kollagens Typ II nicht möglich (Abb. 16, C, D). Die Eindrücke aus der Histologie für Kollagen Typ II korrelierten nicht immer mit den Ergebnissen der Genexpression für COL2A1 (Abb. 17): Die COL2A1-Genexpression war im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt nach 2 Wochen um ca. Faktor 70 erhöht, verringerte sich nach weiteren 2 Wochen auf ca. 28 (Ø RQ-Wert) und hatte sich nach 6 Wochen auf ihr niedrigstes Niveau um das ca. 12,7-fache gegenüber 4 bzw. das ca. 32-fache gegenüber 2 Wochen reduziert. Die Kollagen-Typ-II-Färbung der in NH inkubierten pNSC zeigte nach 4 Wochen eine leichte, nach 6 Wochen eine deutlich positive Färbung in der auf den Scaffolds befindlichen Zellschicht. Aufgrund der Zusammensetzung der pNSC-Scaffolds aus überwiegend Kollagen Typ II war eine Unterscheidung zwischen bereits zuvor vorhandenem und neu synthetisiertem Kollagen II der in das Scaffold eingewanderten Zellen nicht möglich. Innerhalb der den Scaffold umgebenden, dicken Zellschicht resultierte in der immunhistologischen Kollagen-Typ-II-Färbung im Vergleich zum Scaffold nur eine leichte Rotfärbung (Abb. 18). Analog zum BM erhöhte sich, beginnend auf einem relativ hohen Ausgangswert, im Laufe der Zeit in den CPC-besiedelten Scaffolds des NH die mRNA-Expression von COL2A1. Dieser erhöhte sich nach 6 Wochen um das ca. 57-fache (Abb. 17). Die COL2A1-Expression war zum Zeitpunkt nach 6 Wochen im NH-Medium gegenüber dem CDM signifikant höher (RQ-Wert 6900 vs. 2,2, d.h. um das > 3000-fache erhöht). Dieses Ergebnis unterstützte die Eindrücke aus der Immunhistologie der Kollagen-II-Färbung für die Scaffolds des NH-Mediums.

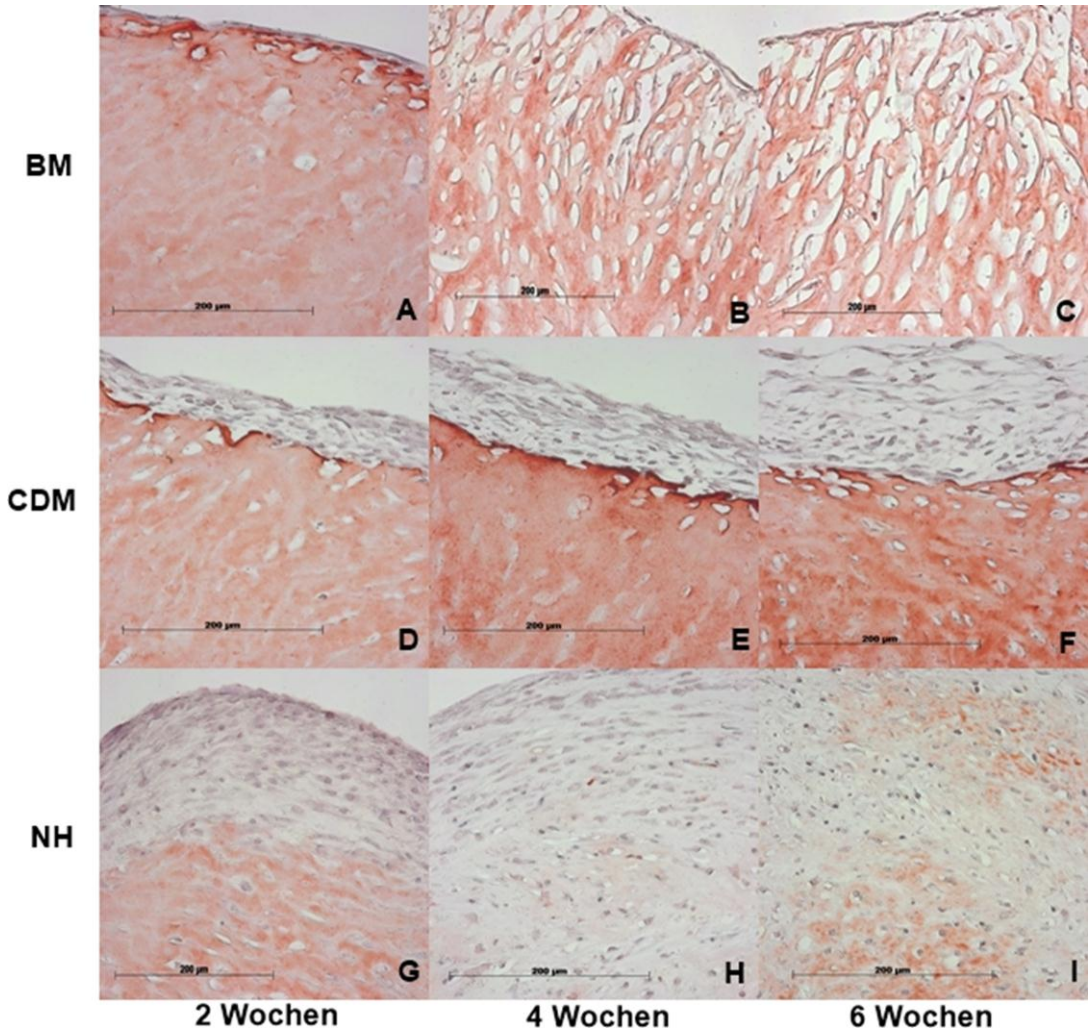


Abbildung 16*: Auswahl Kollagen-Typ-II-Färbung CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM bzw. NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A-C), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM: D-F) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: G-I) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Je 20x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.*

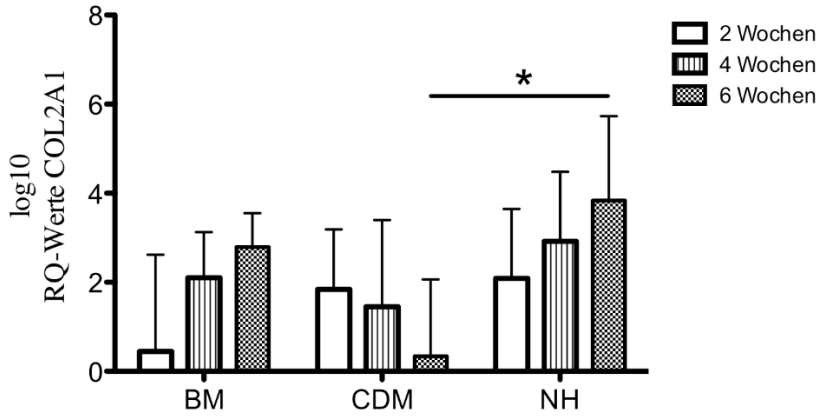


Abbildung 17*: Dargestellt ist jeweils der dekadische Logarithmus (log10) der relativen Quantifizierung der COL2A1-Genexpression von CPC-besiedelten pNSC-Scaffolds. Die Experimente wurden zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt, für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM, je Zeitpunkt n=5), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM, je Zeitpunkt n=4 oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH, je Zeitpunkt n=5) kultiviert und die Genexpression im Vergleich zu CPC direkt vor der Scaffold-Besiedlung bestimmt. Als endogene Kontrolle diente 18S rRNA. Aufgetragen ist der Mittelwert +/- SD. *: p < 0,05. RQ: Relative Quantifizierung; COL2A1: Kollagen Typ II; BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; SD: Standardabweichung (standard deviance).***

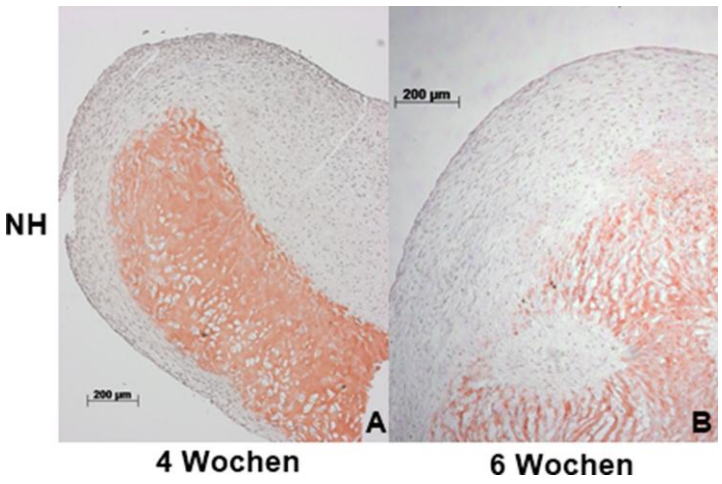


Abbildung 18*: Übersicht der Immunhistologie für Kollagen Typ II CPC-besiedelter, in NH-Medium inkubierter pNSC-Scaffolds. Es wurden Experimente zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: A, B) kultiviert. A: nach 4 Wochen; B: nach 6 Wochen. Längenstandard: 200 µm. A, B: 5x-Vergrößerung. NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.*

3.1.4 Kollagen Typ X

Kollagen Typ X stellt ein hypertrophiespezifisches Gen dar (Lefebvre & Smits 2005, Barry et al. 2001, Koga et al. 2007) und spielt in der terminal hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten eine Rolle (Lüllmann-Rauch 2006), dessen Funktion jedoch nicht genauer aufgeklärt ist.

Mit Hilfe der Immunhistologie für Kollagen Typ X sowie der Bestimmung der Genexpression von COL10A1 (Kollagen Typ X) wurde die Bildung des genannten Kollagens ermittelt. Es konnte immunhistologisch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die Bildung von Kollagen Typ X nachgewiesen werden. Exemplarisch sind entsprechende Färbungen der pNSC nach 6-wöchiger Kultur gezeigt (Abb. 19). Die Genexpression von COL10A1 wies sowohl in Abhängigkeit der verschiedenen Zeitpunkte (2, 4 und 6 Wochen), als auch der Medien (BM, CDM und NH) deutliche Unterschiede auf (Abb. 20). In den Zellen der Scaffolds des BM war die COL10A1-Genexpression im Vergleich mit den anderen Medien zu allen Zeitpunkten auf dem niedrigsten Niveau. In den Zellen der Scaffolds des CDM war bereits nach 2 Wochen eine gegenüber der T_0-Probe ca. 186-fach erhöhte COL10A1-Expression erkennbar, die sich im Verlauf nach 6 Wochen wieder ungefähr auf ein Achtel reduzierte (Abb. 20). Im NH war die initiale COL10A1-Expression nach 2 Wochen gegenüber der T_0-Probe auf ca. 334-fach höherem Niveau. Im Gegensatz zu BM und CDM verstärkte sich die Expression im Verlauf nach 6 Wochen um das 9,5-fache auf ca. 3120 (RQ-Wert). Der Unterschied der Werte zum Zeitpunkt nach 6 Wochen im Vergleich zwischen BM (RQ-Wert ca. 6,2) und NH (RQ-Wert ca. 3160) sowie CDM (RQ-Wert ca. 22) und NH konnte hierbei als höchstsignifikant bzw. hochsignifikant gewertet werden (Abb. 20).

Insgesamt unterschied sich die Genexpression für COL10A1 in allen 3 untersuchten Medien also sowohl deutlich untereinander, als auch von der Immunhistologie für Kollagen Typ X.

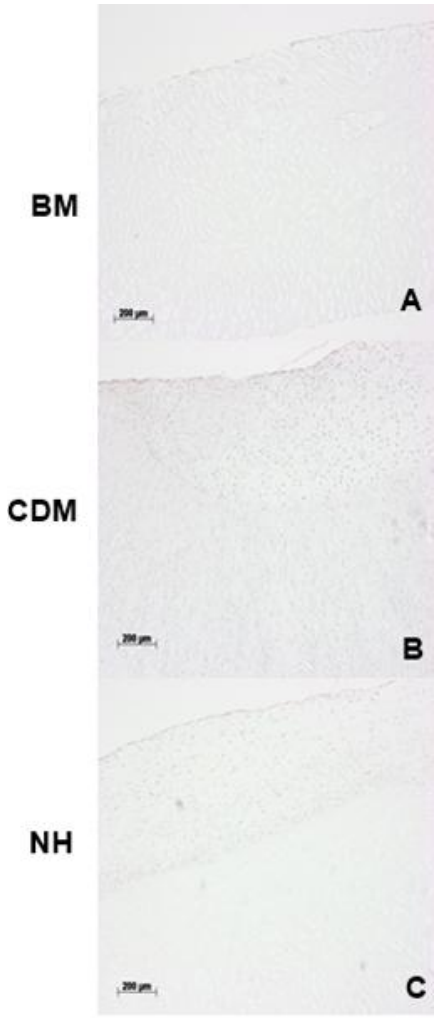


Abbildung 19: ***Kollagen-Typ-X-Färbung CPC-besiedelter pNSC-Scaffolds. Es ist kein histologischer Nachweis von Kollagen Typ X möglich. Es sind repräsentative Färbungen der Experimente (BM, NH: n=4; CDM: n=3) gezeigt, die zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt wurden. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt und für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM: A), chondrogenem Differenzierungs-medium (CDM: B) oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH: B) kultiviert. Längenstandard: 200 µm. Je 5x-Vergrößerung. BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks.***

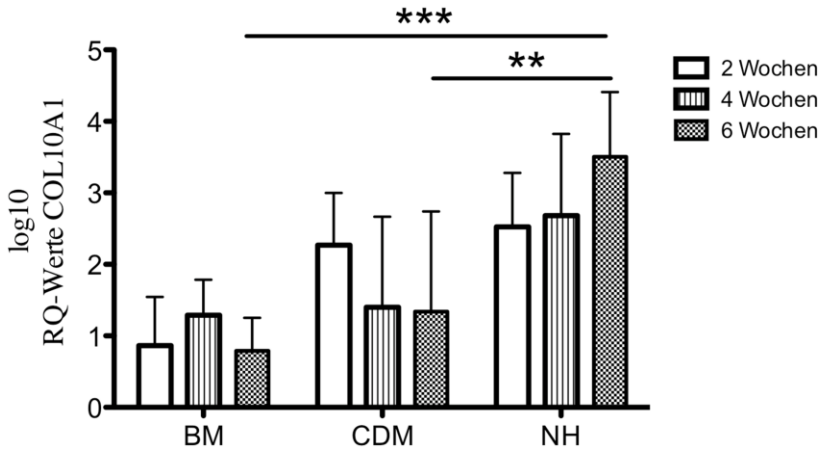


Abbildung 20: ***Dargestellt ist jeweils der dekadische Logarithmus (log10) der relativen Quantifizierung der COL10A1-Genexpression von CPC-besiedelten pNSC-Scaffolds. Die Experimente wurden zur Charakterisierung des Einwanderungs- und Differenzierungsverhaltens von humanen CPC am RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) von 05/2012-12/2012 durchgeführt. Die CPC wurden aus humanen Kniegelenken und aus diesen erhaltenen Knorpelstücken isoliert, die im Rahmen orthopädischer Knie-TEP-Operationen rekrutiert worden waren. Letztere waren aufgrund einer Kniegelenksarthrose durchgeführt worden. Das für die einzelnen Versuche verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt acht Patienten, davon jeweils vier Frauen und Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (mittleres Alter: 64,5 ± 8,7 Jahre). Die Scaffolds wurden mit je 0,5 Mio. CPC besiedelt, für 2, 4 und 6 Wochen in Basalmedium (BM, je Zeitpunkt n=5), chondrogenem Differenzierungsmedium (CDM, je Zeitpunkt n=4 oder NH ChondroDiff-Medium von Miltenyi (NH, je Zeitpunkt n=5) kultiviert und die Genexpression im Vergleich zu CPC direkt vor der Scaffold-Besiedlung bestimmt. Als endogene Kontrolle diente 18S rRNA. Aufgetragen ist der Mittelwert +/- SD. **: p < 0,01, ***: p < 0,001. RQ: Relative Quantifizierung; COL2A1: Kollagen Typ II; BM: Basalmedium; CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium; NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen; pNSC: Porcine nasal septal cartilage; Knie-TEP: Totalendoprothese des Kniegelenks 18S rRNA: 18S ribosomale Ribonukleinsäure; SD: Standardabweichung (standard deviance).***

3.2 Zellschichtbildung und Migrationsaktivität der CPC in pNSC-Scaffolds

Um weitere Vergleiche zwischen den Medien und Zeitpunkten ziehen zu können, wurden die Zellschichtdicke und Migration (=Einwanderungstiefe) der Zellen quantitativ erfasst (Abb. 21, 22).

3.2.1 Zellschichtdicke von CPC auf pNSC-Scaffolds

Die Zellschichtdicke wurde mittels mikroskopischer Ausmessung der Kollagen-Typ-I-Färbung der Scaffolds ermittelt.

Dabei verharrte diese bei Kultivierung der besiedelten Scaffolds in BM auf konstant niedrigem Level (Abb. 21) und blieb sichtbar hinter CDM und NH zurück. Im Verlauf der Kultivierung in CDM war eine deutliche Zunahme der Zellschicht sichtbar (Abb. 21), allerdings war eine große Variationsbreite zwischen den verschiedenen CPC-Spendern festzustellen. Die Zellschichtdicke hatte sich im Durchschnitt im NH nach 4 Wochen im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt nach 2 Wochen um das ca. 2,7-fache erhöht, war im Verlauf jedoch leicht rückläufig (Abb. 21). Der Unterschied zwischen BM und NH zum Zeitpunkt nach 4 Wochen war als signifikant zu bewerten.

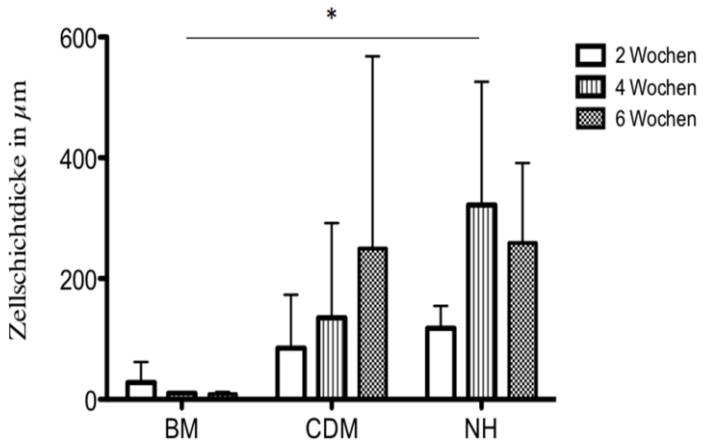


Abbildung 21: ***Zellschichtdicke (Adhäsion) in µm; anhand der erfolgten Gewebeschnitte und der Immunhistologie-Färbung gegen Kollagen Typ I wurden für jeden Versuchsdurchlauf nachträglich die Zellschichtdicke der CPC der jeweils 3 unterschiedlichen Medien und Zeitpunkte gemessen. Ziel war es, die Zellschichtdicke quantitativ besser erfassen zu können. Über die Länge/Breite des Scaffolds verteilt, wurden jeweils links-, dann mittig und rechtsseitig die Zellschichtdicke und anhand von jeweils 3 Werten pro Präparat abgemessen und aus den zugehörigen Werten die Mittelwerte für die einzelnen Medien und Zeitpunkte errechnet. *: Signifikant; BM: Basalmedium, CDM: Chondrogenes Differenzierungsmedium, NH: Nichthämatogenes Differenzierungsmedium; CPC: Chondrogene Progenitorzellen.***

3.2.2 Migration von CPC in pNSC- Scaffolds

Die Migrationsaktivität wurde ebenfalls anhand der mikroskopischen Ausmessung der Einwanderungstiefe der Zellen in der Kollagen-Typ-I-Färbung der Scaffolds bestimmt.

Im BM war nach 4 Wochen gegenüber dem Zeitpunkt nach 2 Wochen eine ca. 2,5-fache Erhöhung zu bemerken sowie ein ca. 4,7-facher Anstieg der Einwanderungstiefe zwischen 2 und 6 Wochen feststellbar, die als signifikant zu bewerten war (Abb. 22). Insgesamt fand in diesem Medium die am deutlichsten bzw. tiefsten zu beobachtende Einwanderung statt. Im Gegensatz hierzu stand das CDM - hier fiel die Einwanderung am geringsten aus. Sie begann nach 2 Wochen auf deutlich geringem Niveau, nahm im Verlauf jedoch ebenso an Größe zu, indem sie nach 4 Wochen um das ca. 2,7-fache und nach 6 Wochen um das ca. 4,6-fache anstieg, jedoch wies letzterer Zeitpunkt eine große

Standardabweichung auf (Abb. 22). Die Einwanderungstiefe im NH-Medium begann im Vergleich mit den beiden anderen Medien auf deutlich höherem Niveau, verstärkte sich nach weiteren 2 Wochen um das ca. 1,6-fache, um schließlich ungefähr auf diesem Level zu bleiben. Beim letzten Zeitpunkt gab es einen großen Fehlerbalken (Abb. 22). An der Scaffoldoberfläche beginnend, wurden am ausgeprägtesten in den pNSC-Scaffolds des NH-Mediums, jedoch stellenweise auch in denen des BM und CDM, bereits nach 2 Wochen gebildete kleine Kanäle sichtbar, die ein Zeichen für die erfolgende Migration darstellten. Die Anzahl der eingewanderten Zellen war ebenfalls abhängig vom Kultivierungsmedium. Bei Kultivierung in NH-Medium wurden am meisten einwandernde Zellen beobachtet, während bei BM und CDM deutlich weniger Zellen in das Scaffold eindrangen.

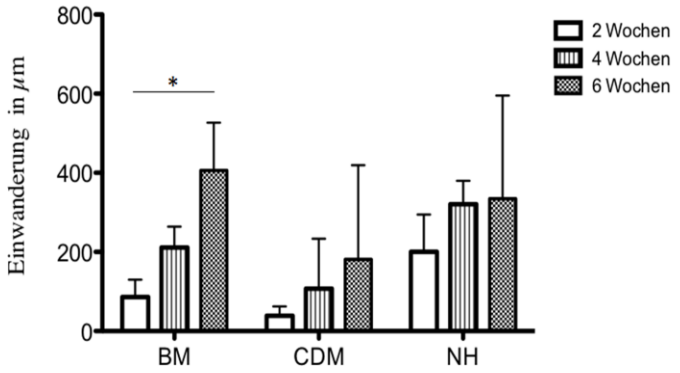


Abbildung 22: ***Einwanderung (Migration) in µm; anhand der erfolgten Gewebeschnitte und der Immunhistologie-Färbung gegen Kollagen Typ I wurden für jeden Versuchsdurchlauf nachträglich die Einwanderungstiefe der CPC je Medium (BM, CDM, NH) und Zeitpunkte gemessen. Ziel war es, die Einwanderungstiefe quantitativ zu erfassen. Über die Länge/Breite des Scaffolds verteilt, wurden jeweils links-, dann mittig und rechtsseitig die Einwanderungstiefe anhand von jeweils 3 Werten pro Präparat abgemessen und aus den zugehörigen Werten die Mittelwerte für die einzelnen Medien und Zeitpunkte errechnet. *: Signifikant; BM: Basalmedium, CDM: Chondrogenes Differenzierungs-medium, NH: Nicht-hämatogenes Differenzierungsmedium, CPC: Chondrogene Progenitorzellen.***

4 Diskussion

Knorpeldefekte stellen im Allgemeinen ein bedeutendes weltweites Problem dar, v. a. da die bisher durchgeführten Therapiekonzepte, wie die ACI, MACI, Mosaikplastik, Anbohrung, Microfracture-Technik und AMIC unbefriedigende Ergebnisse erzielen (Gille et al. 2013, Solheim et al. 2013, Wasiak et al. 2006, Peterson et al. 2000 und 2010, Kock et al. 2012, Matsunaga et al. 2007, Goyal et al. 2013, Müller & Kohn 1999, Hangody et al. 2004, Wakitani et al. 2002, Steinert et al. 2007). Im Falle der AMIC-Methode als Ansatz der Induktion einer *In-situ*-Regeneration über Anbohrung und Einbringen einer Kollagen-Typ-I/III-Matrix stehen Langzeitergebnisse noch aus. Es bleibt fraglich, ob diese Methode aufgrund ihrer unphysiologischen Zusammensetzung im Bezug auf Knorpel langfristig erfolgreich sein wird (Benthien & Behrens 2010, Gille et al. 2010 und 2013). Das Bestreben, adäquaten Ersatz von Knorpelgewebe zu entwickeln, ist daher global immer mehr in den Fokus aktueller Forschungsbemühungen der *In-situ*-Regeneration gerückt.

Die Möglichkeiten der lokalen Rekrutierung von migratorisch aktiven chondrogenen Progenitorzellen des Knorpelgewebes sind bisher nicht näher untersucht worden. Das Ziel der Arbeit war die Testung des vielversprechenden Ansatzes, eine pNSC-Matrix mittels CPC aus humanem Knorpel *in vitro* zu besiedeln, um die Frage zu klären, ob sich ein pNSC-Implantat für die *In situ*-Regeneration als zukünftige Therapie-Alternative von Knorpeldefekten prinzipiell eignet. Dabei wurden das Adhäsions- und Proliferationsverhalten anhand der Zellschichtbildung, das Einwanderungsverhalten und die Matrixsynthese (Kollagene Typ I, II, X und Aggrekan) der Zellen untersucht.

4.1 Voraussetzungen und Beurteilung des Modells

Die CPC, die wie unter 2.7.1.1 angegeben isoliert wurden, wurden vorausgehend MSC-ähnliche Progenitorzellen mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften charakterisiert (Joos et al. 2013). Die Matrix, die für diese Arbeit verwendet wurde, war wie von Schwarz et al. beschrieben, dezellularisiert (Schwarz et al. 2012), wobei das Kollagennetzwerk und die Kollagenfibrillen

erhalten blieben (Schwarz et al. 2012). In dieser vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass sich weder Proteoglykane noch Kollagene Typ I und X in der Matrix der pNSC-Scaffolds histologisch oder immunhistochemisch nachweisen lassen (siehe 3.1, Tab. 5). Auch in der Literatur finden sich teilweise Angaben über die in den Matrizes erfolgte Depletion von Proteoglykanen von 4,82 % ± 0,94 % vor DP auf 1,50 % ± 0,43 % nach DP (Schwarz et al. 2012).
Die unterschiedlichen Medien - BM (serumhaltig), CDM (glucosereich, serumfrei, TGF-β3) und NH (glucosereich, serumhaltig, weitere unbekannte Faktoren) - wurden miteinander verglichen um zu untersuchen, welche Faktoren bei der Rezellularisierung und Zelldifferenzierung eine potentielle Rolle spielen.

4.2 Beurteilung der Zellschichtbildung und Migration der Zellen in den pNSC-Scaffolds

4.2.1 Zellschichtdicke von CPC auf pNSC-Scaffolds

In dieser Arbeit wurde erstmals die Adhärenz humaner CPC des Gelenkknorpels auf den pNSC-Scaffolds gezeigt. Bei Kultivierung in BM veränderte sich die Zellschichtdicke zu allen Zeitpunkten geringfügig und blieb diesbezüglich bereits ab dem frühesten untersuchten Zeitpunkt nach 2 Wochen deutlich hinter dem CDM und NH zurück, wohingegen sie bei Letzteren besonders im NH-Medium im Verlauf stark zunahm. Im NH-Medium war die Zellschichtdicke nach 6 Wochen schließlich leicht rückläufig, im CDM-Medium dagegen, mit großem Fehlerbalken, weiterhin auffallend angestiegen. Der Unterschied der Zellschichtdicke zwischen dem BM und NH war zum Zeitpunkt nach 4 Wochen zudem signifikant. Durch den in dieser Arbeit frühesten untersuchten relativ späten Zeitpunkt von 14 Tagen kann die Zellschicht auch durch Proliferation bereits verdickt sein, sodass ein sicherer Rückschluss auf die anfängliche Adhäsion nicht möglich ist. Yang et al. haben biphasische DCM/DCBM-Scaffolds (DCM: *decellularized cartilage matrix*; DCBM: *decellularized cancellous bone matrix*) mit 1×10^6 MSC in chondrogenem Medium inkl. 20 % FKS besiedelt und bereits nach 4 Tagen eine moderate Zelladhäsion in der oberen Schicht des biphasischen Scaffolds beobachtet (Yang et al. 2011). Durch die unterschiedlichen frühesten Zeitpunkte (hier 14 Tage vs. 4

Tage) ist ein unmittelbarer Vergleich der Zelladhäsion/-proliferation mit Yang et al. nicht möglich. Die durchgeführte Histologie demonstrierte insbesondere bzgl. des NH-Mediums, dass die hier eingesetzte Zellzahl ausreichend war. Insgesamt lässt sich anhand der Untersuchungen durch Yang et al. die Frage klären, welche Adhäsion der Zellen an den Scaffolds zu erwarten ist: Durch den in dieser Arbeit frühesten untersuchten und damit relativ späten Zeitpunkt von 14 Tagen ist die Zellschicht mitunter durch Proliferation bereits verdickt, wohingegen bei Yang et al. das Anfangsstadium untersucht wurde, in dem Proliferation noch eine geringere Rolle spielt. Verwendet wurden ebenfalls eine dezellularisierte Knorpelmatrix und Medium mit Serum und Wachstumsfaktoren. Es bleibt zu vermuten, dass anfangs bei allen Medien eine relativ dünne Zellschicht adhäriert. Yang et al. konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass bei Besiedlung einer dezellularisierten kaninen Knorpelmatrix mit 1×10^6 MSC und anschließender Kultivierung in serumhaltigem Differenzierungsmedium mit Wachstumsfaktoren nach 4 Tagen nur eine dünne, meist einlagige Zellschicht auf dem Scaffold zu beobachten war. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch in der vorliegenden Arbeit bei Kultivierung mit NH und CDM zunächst nur eine dünne, meist einlagige Zellschicht vorhanden war. Auch Lee et al. konnte in serumhaltigem Medium ohne Wachstumsfaktoren auf mit Chondrozyten besiedelten Kollagen-II-Scaffolds nach 4 Wochen histologisch beobachten, dass sich die Mehrheit der Zellen in einer durchgängigen, 8-10 Zellschichten umfassenden Schicht um die Peripherie des jeweiligen Scaffolds gesammelt hatte (Lee et al. 2003).

Schwarz et al. hatten in einem der vorliegenden Arbeit ähnlichen Versuchsaufbau pNSC-Scaffolds mit je einer doppelt so großen Zellzahl mit humanen Chondrozyten (hCh) aus Nasenknorpel besiedelt ($1x10^6$ vs. $0{,}5x10^6$ Zellen) und bei Kultivierung in serumhaltigem Medium ohne Wachstumsfaktorzusatz ebenfalls weniger Zellen nachgewiesen als bei Kultivierung in NH (Schwarz et al. 2012). Die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums beeinflusst also die Ausbildung der Zellschicht auf den pNSC-Scaffolds. Während im BM bei einer Glucosekonzentration von 1 g/l 10 % Serum zugegeben wurde, welches eine sehr komplexe Mischung aus Plasmaproteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen etc.

beinhaltet (persönliche Mitteilung durch Biochrom/Merck Millipore/Merck KGaA, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, 2015), enthält das serumfreie CDM neben anderen Bestandteilen den Wachstumsfaktor TGF-β3, eine höhere Glucosekonzentration von 4,5 g/l, Ascorbinsäure (0,2 mM) und Natriumpyruvat (1 mM) (vgl. 2.6.2.2). NH enthält mit 4,13 g/l eine dem CDM ähnlich hohe Glucosekonzentration. Zudem beinhaltet es einen nicht näher spezifizierten Cocktail aus Wachstumsfaktoren und Serum (persönliche Mitteilung durch Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, 2012), sodass lediglich Spekulationen über weitere Medienzusätze als die aufgeführten (u. a. L-Ascorbinsäure) möglich sind.

Die Ausbildung einer unterschiedlich dicken Zellschicht auf den Scaffolds zu den untersuchten Beobachtungszeitpunkten kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise begünstigte die Adhärenz vieler Zellen bei der Besiedlung der pNSC-Scaffolds die Zellschichtbildung, indem eine gegenseitige Stimulation der Zellen in Abhängigkeit der Zellvitalität u. a. zu Mitose und damit Zellproliferation sowie daraus folgend mehr Matrixbildung im Sinne eines positiven Regelkreises ermöglicht werden konnte. Der Zusatz von TGF-β3 in CDM bzw. einem Cocktail verschiedener Wachstumsfaktoren im NH-Medium könnte evtl. ein Grund für eine gesteigerte Zelladhäsion sein, die wiederum eine größere Zellschichtdicke zur Folge hätte. Gorvy et al. hatten in einem Mausmodell mit Verletzung des Peritoneums u. a. durch Zusatz von TGF-β3 teilweise eine gesteigerte Gewebeadhäsion beobachtet (Gorvy et al. 2005). Tudela et al. zeigten ebenfalls in einem Mausmodell über die Gaumenfusion die Notwendigkeit von TGF-β3 für die Epithelzell-Adhäsion und Zell-Zell-Verbindungen (Tudela et al. 2002). Gründe für die Variabilität der Zellschichtdicke der besiedelten pNSC-Scaffolds im CDM könnten mitunter in Unterschieden der Qualität der verwendeten TGF-β3-Chargen begründet liegen. Eine weitere Ursache von Differenzen in der Zellschichtbildung könnte desweiteren auf eine unterschiedliche Zellvitalität zurückzuführen sein. Eine der Wirkungen der L-Ascorbinsäure könnte neben deren Funktion als Cofaktor für die Kollagenbiosynthese als Medienbestandteil in CDM und NH im Bezug auf die Zellschichtdicke besonders die der Schutzfunktion von Zellen als Antioxidans (Hauser 2008) und damit die Rolle als Radikalfänger bei Gefahr der

Schädigung von Zellstrukturen (Becher & Winsel 1989), z. B. als Folge von Stress bei der Besiedlung, gewesen sein. Dies könnte den Zellen im CDM und NH einen entscheidenden Überlebensvorteil gegenüber dem BM gegeben haben und deren dickere Zellschicht erklären. Im Falle des CDM könnte außerdem der Zusatz des Natrium-Pyruvats durch dessen protektive Wirkung gegen Wasserstoffperoxid einer Zellschädigung vorgebeugt haben (Giandomenico et al. 1997).

Ein dritter Punkt zu den unterschiedlichen Zellschichtdicken auf den Scaffolds in Abhängigkeit des Zeitverlaufs sind medienabhängige Diskrepanzen in der Zellproliferationsrate. Die unterschiedlich starke Proliferation kann möglicherweise auf den Differenzierungsstatus der Zellen zurückgeführt werden, die mit chondrogenem Phänotyp nicht mehr proliferativ wären (Lüllmann-Rauch 2006). Eine Überlegung wäre, dass unter Umständen in allen drei Medien zunächst nur eine einzelne Zellschicht an der Oberfläche der pNSC-Scaffolds adhärierte und im weiteren Zeitverlauf medienabhängig proliferierte. Die Stagnation der Zellschichtdicke auf den pNSC-Scaffolds des BM legt einen hohen Anteil an Zellen mit chondrogenem Phänotyp und Morphologie nahe, wie auch schon Schwarz et al. bei einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Chondrozyten vermuteten (Schwarz et al. 2012). Allerdings konnten Joos et al. zwar in CDM, jedoch nicht in BM eine chondrogene Differenzierung von CPC nachweisen (Joos et al. 2013). Der zweite Grund für starke Proliferation im Verlauf ist die Nährstoffversorgung. Das CDM ist mit 4,5 g/l Glucose und Natriumpyruvat - ebenfalls eine Energiequelle (Giandomenico et al. 1997) - gegenüber dem BM mit 1 g/l Glucose im Bezug auf die Nährstoffversorgung im Vorteil. Eventuell verhinderte eine limitierte Versorgung der Zellen im BM die Ausbildung einer deutlichen Zellschicht. Eine andere mögliche Erklärung wäre die Beeinträchtigung der glukose-abhängigen Synthese der GAG-Seitenketten der Proteoglykane. Desweiteren ist als Ursache von unterschiedlichen Zellproliferationsraten der Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF-β3 entscheidend, da hierunter die Proliferation gesteigert werden kann (Rose & Oreffo 2002), wie auch in dieser Arbeit im Vergleich zwischen den Zellen im BM und dem CDM beobachtet werden konnte. Bei Kultivierung der besiedelten Scaffolds in NH wurden ebenfalls konstant hohe und zeitabhängig steigende Werte für die Zellschichtdicke beobachtet. Dieser Befund könnte einen Hinweis

darauf geben, dass der Hersteller auch hier einen höheren Glucoseanteil als 1 g/l sowie Wachstumsfaktoren wie TGF-β3 eingesetzt hat. Der erhöhte Glukoseanteil in CDM und NH könnte also die GAG-Synthese der Proteoglykane erhöht haben. Zudem ist bekannt, dass GAG eine schnelle Diffusion wasserlöslicher Stoffe ermöglichen und somit durch bessere Nährstoffversorgung indirekt die Zellteilung unterstützt haben. Außerdem spielen Proteoglykane bei der Signalübertragung eine wichtige Rolle, indem sie u. a. TGF-β binden können und somit Einfluss auf das Zellwachstum ausüben (Hauser 2008). Die Zellschichtdicke präsentierte sich bei Kultivierung in CDM viel variabler als in NH. Möglicherweise ist der Zusatz von FKS im NH, aber evtl. ebenso das Zusammenspiel desselben mit den im NH zugesetzten Wachstumsfaktoren eine entscheidende Komponente für eine reproduzierbare Induktion der Zellproliferation. Die Zusammensetzung, i.e. der Faktor-Cocktail des NH-Mediums könnte den von Seol et al. beschriebenen klonogenen, proliferativen Phänotyp der CPC (Seol et al. 2012) insgesamt am optimalsten gefördert haben.

Hinsichtlich der Kultivierungszeit wurde im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit auch bei Schwarz et al. eine ähnliche Veränderung der Zellschichtdicke beobachtet (Schwarz et al. 2012). Schwarz et al. fanden im Laufe der Kultivierung von mit Chondrozyten besiedelten Scaffolds in BM ebenfalls weniger adhärente Zellen und damit eine dünnere Zellschicht verglichen mit dem NH vor. Sie beobachteten eine zeitliche Zunahme der Zellschichtdicke in NH, die sich zwischenzeitlich leicht rückläufig zeigte, was in dieser Arbeit lediglich bei den im BM inkubierten pNSC-Scaffolds beobachtet werden konnte (Schwarz et al. 2012). Die pNSC-Scaffolds des CDM und NH dieser Arbeit zeigten eine gegenüber dem Zeitpunkt nach 14 Tagen nach 42 Tagen eine deutlich dickere Zellschicht, sodass Schwarz et al. alles in allem bzgl. der Kultivierungszeit also ähnliche Beobachtungen wie in vorliegender Arbeit machten.

Vickers et al. haben die Kontraktion eines Zellpellets im Bezug auf die Chondrogenese untersucht. In einem ähnlichen Versuchsaufbau von mit kaninen artikulären Chondrozyten besiedelten chemisch quervernetzten Kollagen-Typ-II-GAG-Scaffolds, haben sie nach 14 Tagen Kultivierung je heterogene Zellzahlen mit differierender GAG-Synthese beobachtet. Dabei wurde bei weniger

quervernetzten Scaffolds eine vergleichsweise erhöhte Zelldichte mit vermehrter GAG-Synthese bzw. Chondrogenese festgestellt. Es wurde vermutet, dass die Zunahme der Dichte in der EZM die Diffusion von Nährstoffen erschwert und den O_2-Partialdruck reduziert haben und damit die Chondrogenese stimuliert haben könnte (Vickers et al. 2006). Diese wiederum kann die Zellteilung verringert haben, was insgesamt zu einer Reduktion der Zellzahl geführt haben könnte. Die im Verlauf der Kultivierung mit NH abnehmende Zellschichtdicke der pNSC-Scaffolds in der vorliegenden Arbeit könnte ebenfalls auf Diffusionslimitierung zurückzuführen sein. Eine andere Arbeitsgruppe hatte zudem in einem *In-vitro-/In-vivo*-Versuch mit MSC bereits beobachtet, dass die Expression von Hypertrophie-assoziierten Genen bzw. der Verlust des chondrogenen Phänotyps mit Zelltod in Verbindung gebracht werden kann (De Bari et al. 2004). Diese Vermutung ist in dieser Arbeit insbesondere auf die besiedelten Scaffolds des NH-Mediums zutreffend, da hier die Zellschicht im Zeitverlauf regredient war. Auch wenn in dieser Arbeit nur *In-vitro*-Versuche durchgeführt und ein anderer Zelltyp verwandt wurden, sodass ein Vergleich mit o.g. Versuchsaufbau daher nur relativ gesehen werden kann, können dennoch Parallelen zu dieser Arbeit gezogen werden.

4.2.2 Migration von CPC in pNSC-Scaffolds

Tendenziell zeigte sich bei den Zellen der pNSC-Scaffolds, die im BM inkubiert wurden, im Zeitverlauf die größte Zunahme der Einwanderungstiefe sowie beim Messzeitpunkt nach 6 Wochen durchschnittlich die höchsten Werte der absoluten Einwanderungstiefe. Der Unterschied der Einwanderungstiefe zum Messzeitpunkt nach 6 Wochen ist im Vergleich zu dem nach 2 Wochen signifikant. Am geringsten ist die Einwanderung der Zellen dagegen im CDM, wobei sie sich im Verlauf ca. verdoppelt und vervierfacht. Im NH-Medium ist die Einwanderungstiefe nach 2 Wochen im Vergleich mit den anderen Medien deutlich größer, verstärkt sich nach 4 Wochen um mehr als ein Drittel und bleibt danach ca. auf diesem Level.

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede zwischen den Medien stellt sich die Frage nach den hierfür möglichen Gründen. An der Scaffoldoberfläche beginnend, zeigten sich am deutlichsten im NH-Medium ausgeprägt, im Zeitverlauf gebildete kleine Kanäle, die ein Zeichen für die erfolgende Migration darstellten.

Auffallend ist die zeitlich durchgängig dünne Zellschicht innerhalb des BM und die gleichzeitige starke Einwanderungstiefe der Zellen. Fraglich ist, ob diese beiden Elemente im direkten Zusammenhang stehen könnten. Möglicherweise förderte eine dünne Zellschicht bei einzelnen Zellen die Adhärenz an der Porenwand der pNSC-Scaffolds, da wenige Zellen sich evtl. räumlich weniger gegenseitig behinderten und somit die Ausbildung von Pseudopodien besser möglich wurde. Ke et al. beschrieben die Adhärenz von Chondrozyten an die Wand der inneren Makroporen von Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat) (PHBV)/Polyacrylamid (PAM)-Scaffolds, die sie zuvor mit Chondrozyten besiedelt hatten. Sie beobachteten, dass die Chondrozyten in der Lage waren, kurze Pseudopodien gegen die Wandoberfläche herauszustrecken (Ke et al. 2014). CPC als knorpelstämmige Zellen könnten ebenfalls diese Eigenschaft aufweisen. Die mit BM inkubierten CPC in und auf den Scaffolds zeigten im Vergleich zu NH und CDM möglicherweise deshalb die stärkste Tendenz zur Migration, da sie vermutlich noch eher als die Zellen in den beiden anderen o.g. Medien am Beginn der chondrogenen Differenzierung standen und somit im Status mit Stammzellcharakter noch eine stärkere Tendenz zur Migration (Koelling et al. 2009) aufwiesen als im Allgemeinen vollständig differenzierte Zellen bzw. die evtl. bereits weiter differenzierten Zellen im NH und CDM. Der Beginn der chondrogenen Differenzierung bei den CPC im BM wurde durch die im Zeitverlauf steigende ACAN- und COL2A1-Expression (Koelling et al. 2009), die zeitlich durchgehend niedrigen COL1A1- und die im Vergleich zu den anderen Medien relativ geringen COL10A1-Durchschnittswerte bei fehlender Matrixsynthese untermauert.

Im Umkehrschluss zur geringen Zellschichtdicke und starken Tendenz zur Migration stünde die Hypothese, dass eine dickere Zellschicht einen teilweise hemmenden Einfluss auf die Einwanderungstiefe der CPC in die pNSC-Scaffolds haben könnte. Diese Vermutung wird von den Beobachtungen im CDM gestützt. Hier steigt die Zellschichtdicke im Verlauf der Zeit auffallend deutlich an, die Einwanderungstiefe bleibt aber sichtbar hinter den anderen Medien zurück, wenngleich auch sie zunimmt. Allerdings kann diese Hypothese insgesamt nur mit Einschränkungen übernommen werden, da die Zellschichtdicke im NH-Medium vergleichsweise stark ausfällt, die Einwanderung nach 2 und 4 Wochen jedoch eben-

so am größten ist und lediglich nach 6 Wochen eher stagniert bzw. bei großen Schwankungen durchschnittlich nur noch leicht ansteigt. Andererseits fällt zu letzterem Zeitpunkt der Wert der Zellschichtdicke leicht ab, bei parallel hierzu leicht steigender Einwanderungstiefe, sodass diese Beobachtung die oben ausgeführte Hypothese unter Vorbehalt wiederum geringfügig stützen würde. Koelling et al. entdeckten einhergehend mit der Überexprimierung von Kollagen I eine signifikante Zunahme von MMPs und anderen Matrix-degradierenden Enzymen in CPC, die zur Migrationsaktivität der Zellen beitragen könnten (Koelling et al. 2009). Eine positive Korrelation des Maßes an Kollagen-Typ-I-Expression und einem gesteigerten Migrationspotential wurde auch bei der Einwanderung von nasalen CPC (nsCPC) in pNSC-Scaffolds beobachtet (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für HNO-Heilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014). In dieser Arbeit stimmt diese Vermutung am ehesten mit den im NH-Medium kultivierten besiedelten pNSC-Scaffolds überein. Die Besiedlung der pNSC-Scaffolds mit nsCPC und humanen Chondrozyten (hCh) bzw. die alleinige Besiedlung der Scaffolds mit hCh und Inkubation beider Zellarten in NH-Medium ergab bzgl. deren Migrationsverhalten übereinstimmend bereits innerhalb der ersten 2 Wochen eine aktive Migration beider Zellarten, die sich durch an der Scaffoldoberfläche gebildete kleine Kanäle zeigte (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für HNO-Heilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Schwarz et al. 2012), was die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse insbesondere des NH-Mediums -und mit Einschränkungen CDM- unterstützt. Dabei erfolgte die nsCPC-Migration früher und ausgeprägter als die der hCH, was die zukünftige Anwendung dieser Zellart zusammen mit den pNSC-Scaffolds sinnvoll erscheinen ließe (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für HNO-Heilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014). Die Bildung von Kanälen in der Matrix der pNSC-Scaffolds könnte ein Hinweis darauf sein, dass matrixdgradierende Enyzme die Migrationsaktivität der CPC beeinflussen. Die MMP-Bildung wurde in dieser Arbeit zwar nicht untersucht, aber Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Genexpression von MMP13 und ADAMTS4 in NH und BM tendenziell verstärkt wurde während die MMP1 und MMP9-Genexpression in NH - im Gegensatz zur Kultivierung in BM - abreguliert wurde (persönliche Mitteilung durch Helga Joos, Universitätsklinikum Ulm, Klinik

für Orthopädie am RKU, Sektion. Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen 2014). MMP2 wurde zwar auf Genexpressionsebene durch die unterschiedlichen Medien nicht reguliert, die Kultivierungsüberstände zeigten in der Gelatine-Zymographie aber bei NH eine wesentlich höhere MMP2-Aktivität als bei BM, was vermutlich auf die höhere Zellzahl zurückzuführen war (persönliche Mitteilung durch Helga Joos, Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Orthopädie am RKU, Sektion. Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen 2014). Möglicherweise könnte das Kultivierungsmedium über die differentielle Induktion von MMPs die Migrationsaktivität modulieren. Eine weitere mögliche Ursache für die Migration, insbesondere im CDM und NH, ist der relative Mangel an Nährstoffen je dichter die Zellschicht sich entwickelt, welcher einige Zellen, womöglich tendenziell die näher an der Oberfläche des pNSC-Scaffolds befindlichen, dazu zwingen könnte in unbesiedelte Bereiche der Matrix vorzustoßen, in denen eine bessere Nährstoffversorgung gewährleistet ist. Die durch die Dezellularisierung entstandenen Poren der Kollagen-II-Matrix sind als Zielorte der Migration womöglich besonders geeignet, weil Medium in die Öffnungen eindringen konnte und hier die weitere bzw. bessere Zufuhr an Nährstoffen sichergestellt war. Da die Einwanderungstendenz der Zellen innerhalb der pNSC-Scaffolds im BM und NH größer ausfiel als im CDM und zuerst genannte Medien jeweils FKS beinhalten, wäre es denkbar, dass dieses durch seine in ihm enthaltenen -teilweise unbekannten- Inhaltsstoffe wie z. B. Wachstumsfaktoren die Zellen zur Migration angeregt haben könnte. Auch Lee et al. konnte in serumhaltigem Medium ohne Zugabe weiterer Wachstumsfaktoren auf mit Chondrozyten besiedelten Kollagen-II-Scaffolds nach 4 Wochen histologisch eine Zellverteilung im gesamten Scaffold beobachten (Lee et al. 2003).

4.3 Matrixsynthese - ACAN (Aggrekan), Kollagene Typ I, II, X werden medien- und versuchsabhängig unterschiedlich stark exprimiert und gebildet

Mit Ausnahme der angefärbten Zellkerne war in beiden Alcianblaufärbungen (pH 1 und 2,5), der Safranin-O-färbung und der Immunhistologie (Kollagene Typ I,

II, X) bei den im Basalmedium inkubierten pNSC-Scaffolds ansonsten durchgehend zu keinem Zeitpunkt (2, 4 und 6 Wochen) eine wesentliche (Proteoglykanfärbungen, Immunhistologie Kollagen X) bzw. nur eine leichte Färbung (Immunhistologie Kollagen I, II) erkennbar. Somit waren histologisch in den pNSC-Scaffolds keine Proteoglykane, kein Kollagen Typ X und wenig Kollagen Typ I und II nachweisbar, wohingegen diese Erkenntnis zu großen Anteilen mit der Genexpression für ACAN, COL1A1, COL2A1 und COL10A1 im Widerspruch stand. Hier ließen sich im zeitlichen Verlauf eine steigende Genexpression für ACAN, COL2A1, eine Herabregulation von COL1A1 sowie im Vergleich mit den anderen beiden Medien die geringste COL10A1-Genexpression feststellen. Beim Zeitpunkt nach 6 Wochen war die COL10A1-Expression der Zellen des NH-Mediums gegenüber dem BM höchstsignifikant. Die Zellen des BM zeigten bezogen auf die Genexpression vergleichsweise den geringsten, die des NH-Mediums den ausgeprägtesten Grad der Hypertrohpie. Möglicherweise sind posttranskriptionelle Regulations-mechanismen ein Grund dafür, dass Genexpression und Proteinexpression der Matrixkomponenten nicht übereinstimmen.

Die fehlende Proteoglykan- und nur geringgradig sichtbare Kollagen-Typ-II-Synthese der Zellen der besiedelten pNSC-Scaffolds in BM ist vermutlich auf die geringe Zellschichtdicke, i.e. der relativ niedrigen Anzahl an Zellen, zurückzuführen. Möglicherweise war hierdurch die gegenseitige Zellstimulation zu gering, um im beobachteten Zeitraum von max. 6 Wochen tatsächlich eine relevante Menge an Matrixproteinen zu bilden. Veilleux et al. hatten in mit Chondrozyten aus adultem Kaninchengelenkknorpel besiedelten Kollagen-Typ-II-Matrizes eine deutliche Proliferation und Biosynthese von Proteinen und Proteoglykanen festgestellt (Veilleux et al. 2004), sodass man andererseits daraus schlussfolgern könnte, dass eine geringe Zellproliferation eine geringe Biosynthese zur Folge hätte, was sich in dieser Arbeit für die in BM kultivierten pNSC-Scaffolds bestätigen ließe. Die deutliche ACAN-, COL2A1-, Herabregulation von COL1A1 sowie die niedrige COL10A1-Genexpression der pNSC-Scaffolds im BM, wobei Letzteres einen niedrigen Grad der Hypertrophie der Zellen widerspiegelt (Barry et al. 2001, Lefebvre & Smits 2005, Mueller & Tuan 2008),

legten andererseits die Vermutung nahe, dass die Zellen allmählich begannen sich chondrogen zu differenzieren. Allerdings fand an dieser Stelle keine sichtbare flächige Matrixsynthese durch die Zellen statt. Diese Beobachtungen sind, wie schon in der Diskussion der Zellschichtdicke und Migration, mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Medienbestandteile des Basalmediums zurückzuführen. Auch hier ist die Vermutung plausibel, dass das Fehlen von ausreichend Glucose, L-Ascorbinsäure und Wachstumsfaktoren wie TGF-β3 eine Verlangsamung bzw. Behinderung der Matrixsynthese zur Folge hatte. Die große Tendenz der Zellen zur Migration lag wahrscheinlich in den Stammzelleigenschaften der CPC begründet (Koelling et al. 2009) und wurde durch den Zusatz von FKS stimuliert, wie unter dem Punkt 4.2.2 bereits diskutiert wurde. Die Migration könnte insgesamt jedoch einen starken Energieverlust der Zellen verursacht haben, sodass die flächige Matrixbildung in der Zeitspanne von 6 Wochen zunächst ausblieb.

In CDM zeigten sich in der Alcianblaufärbungen (pH 1 und 2,5), der Safranin-O-Färbung und der Immunhistologie (Kollagene Typ I, II, X) bei den pNSC-Scaffolds versuchsabhängig unterschiedliche histologische Ergebnisse. Es waren histologisch, bei insgesamt 3 auszuwertenden Versuchen des CDM, zweimal kaum Proteoglykane, kein Kollagen Typ II, eine moderate Menge an Kollagen Typ I und nie Kollagen Typ X nachweisbar, was in einem weiteren Versuch histologisch größtenteils widerlegt wurde, sich auf Ebene der Genexpression jedoch wie im Folgenden beschrieben präsentierte: Hier blieb die Genexpression von ACAN zu allen Zeitpunkten auf konstant niedrigem Niveau. Die COL1A1-Genexpression war insgesamt herunterreguliert, wohingegen die COL2A1-Genexpression im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt sich nach 2 Wochen um ca. Faktor 70 erhöhte. Dies spricht zunächst für einen geringen Grad der Dedifferenzierung der Zellen. Jedoch verminderten sich die COL2A1- und COL10A1-Genexpression im Laufe der Kultivierung. Der Zeitpunkt nach 6 Wochen zwischen CDM und NH war für COL2A1 dabei signifikant bzw. für ACAN und COL10A1 hochsignifikant. Aufgrund der zweimal eher negativ- und einmal deutlich positiv ausfallenden Histologie für die Matrixbestandteile Proteoglykane und die Kollagene Typ I und II sowie der sich über alle Zeitpunkte erstreckenden niedrigen

Genexpression für Proteoglykane sowie der insgesamt variablen COL1A1-, in Abhängigkeit der Zeit deutlich sinkenden COL2A1- und COL10A1-Genexpression in den pNSC-Scaffolds des CDM ist es nicht möglich, eine endgültige Aussage über die Tendenz dieses Mediums zu treffen. Die Unterexprimierung knorpelspezifischer Gene wie Kollagene Typ II, X und Aggrekan von CPC wurde dabei schon an anderer Stelle beschrieben (Seol et al. 2012) sowie der Bedarf von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), einem Matrix-degradierenden Enzym (Koelling et al. 2009), zur Differenzierung und Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus deren Ruhezustand (Heissig et al. 2002).

Die Gründe für die Inkonsistenz der Versuche können hierbei vielfältig sein: Da die CPC der Spender der einzelnen Versuche, in denen das CDM verwendet wurde, zweimal weiblich, je einmal weiblich/männlich sowie zweimal männlich gepoolt waren und bei letzterer Bedingung, dem Pooling der CPC von zwei männlichen Spendern, die Zellen in den pNSC-Scaffolds verglichen mit den vorherigen Versuchen histologisch eine gute Adhäsion, Proliferation, Migration und Bildung von Matrixkomponenten demonstrierten, könnte man einen Zusammenhang mit dem Geschlecht annehmen. Richette et al. fanden eine signifikant höhere Prävalenz und klinische Manifestation von Arthrose bei postmenopausalen Frauen, verglichen mit Männern gleichen Alters (Richette et al. 2003). Diese Tatsache dient als Hinweis für die Möglichkeit, dass die CPC von weiblichen Spendern (Durchschnittsalter der eingesetzten CPC von weiblichen Spendern im CDM ≈ 66 Jahre) durch die stärkere Ausprägung von Arthrose bedingt qualitativ gegenüber den männlichen evtl. insuffizienter waren und negativen Einfluss auf die Matrixsynthese ausgeübt haben könnten. Da Irie et al. zeigten, dass in kastrierten Kaninchen ein Fehlen von Testosteron zu Apoptose und Verringerung der Zellproliferation führte (Irie et al. 2005), wäre der Umkehrschluss möglich, dass eine höhere Testosteronkonzentration eine verminderte Apoptose und vermehrter Zellproliferation zur Folge haben könnte, was Koelling und Miosge allgemeiner als positiven Einfluss physiologischer Testosteronspiegel auf das regenerative Potential der CPC beschrieben (Koelling & Miosge 2010). Zwar bilden CPC selbst kein Testosteron und können somit auch dessen Konzentration *in vitro* nicht modulieren. Dennoch wäre es möglich, dass geschlechtsspezifisch

eine unterschiedliche Expression der Rezeptoren auf den CPC vorhanden ist und den Zellen somit geschlechtsabhängig tendenziell unterschiedliche Reaktionen bzw. Fähigkeiten gestattet: Möglicherweise konnte hierdurch das Fehlen von FKS im CDM im Sinne einer gesteigerten Adhäsion, Proliferation, Migration und der Bildung von Matrixkomponenten wie Proteoglykanen und Kollagenen durch das Pooling von CPC zweier männlicher Spender in einem Fall kompensiert werden. Die Kombination aus fehlendem fötalem Kälberserum und geringer Testosteronkonzentration bzw. „femininer Rezeptorenkonstellation“ könnte wiederum die Ursache für geringe Adhäsion, Proliferation, Migration und Bildung von Matrixkomponenten darstellen. Zudem zeigten Koelling & Miosge, dass ein intrinsischer Unterschied des Genexpressionsmusters zwischen Frauen und Männern für verschiedene in CPC exprimierten Genen vorhanden ist (Koelling & Miosge 2010). Dieser könnte im Hinblick auf das Pooling der CPC und der erfolgten bzw. nicht erfolgten Bildung von Kollagenen und Proteoglykanen ausschlaggebend gewesen sein.

Nicht außer Acht lassen sollte man neben dem Fehlen von FKS außerdem den möglichen Einfluss und die Anzahl bzw. Kombination von Komorbiditäten der Zellspender auf die Zellvitalität, der nicht abschließend geklärt ist. Auch Qualitätsunterschiede und damit Inkonsistenzen der unterschiedlichen Chargen desselben Herstellers des verwendeten TGF-β3, dessen eigentliche Wirkung die stärkere Einlagerung von GAGs und Kollagen Typ II darstellt (Barry et al. 2001), könnten die versuchsabhängige Variabilität der Matrixsynthese innerhalb der pNSC-Scaffolds des CDM erklären. Die zu Beginn nach 2 Wochen relativ niedrige COL1A1- in Kombination mit einer gleichzeitig ausgeprägten COL2A1-Genexpression lässt zunächst über eine schnell erfolgte chondrogene Differenzierung mutmaßen. Jedoch erinnert die lediglich geringgradig vorhandene ACAN- bzw. starke COL10A1-Genexpression an ein Stadium zwischen dem eines prähypertrophen (EZM-Marker Kollagen Typ II, Aggrekan, (Kollagen Typ X)) und eines hypertrophen Chondrozyten (EZM-Marker Kollagen Typ X) (Lefebvre & Smits 2005). Interessant war die Tatsache, dass insbesondere zum Zeitpunkt nach 6 Wochen in der Genexpression aller in dieser Arbeit bestimmten Gene, i.e. ACAN, COL1A1, COL2A1, COL10A1, gegenüber den anderen Zeitpunkten

entweder auf ähnlich niedrigem oder auf deutlich niedrigerem Niveau waren. Evtl. ist dies als Folge von gesunkener Vitalität bzw. einsetzender Seneszenz der Zellen in Form von terminalen Chondrozyten (Lefebvre & Smits 2005) zurückzuführen, sodass die Genexpression im Allgemeinen herunterreguliert wurde. Der Verlust der Zellvitalität bzw. das Einsetzen der Zell-Seneszenz könnte evtl. auf die Folgen der o.g. Kapazitätsauslastung der Zellen sowie den im Verlauf zunehmenden und nicht mehr mittels ITS als Serumersatz kompensierbaren Nährstoffmangel durch die Abwesenheit von FKS bei tendenziell wachsender Zellschicht zurückzuführen sein. Auch der Medienzusatz bzw. die Konzentration des Dexamethasons zur chondrogenen Differenzierung und der L-Ascorbinsäure zur Chondrogenese und Proteoglykansynthese (Awad et al. 2003) sowie die Kombination aller Inhaltsstoffe könnten insgesamt nicht ausreichend gewesen sein, um eine zuverlässige Matrixsynthese durch chondrogen differenzierte Zellen sicherzustellen. In der Literatur sind außerdem veränderte Nährstofftransportwege (Asanbaeva et al. 2007) und eine veränderte extrazelluläre biochemische Umgebung mit einer Modulation der Kollagenbildung (Saeidi et al. 2009) in Verbindung gebracht worden.

Bei den pNSC-Scaffolds im NH-Medium zeigten sich histologisch in der Ausprägung der Bildung von Matrixkomponenten versuchsabhängig variable, aber gleichzeitig jeweils bereits zum frühesten Zeitpunkt nach 2 Wochen deutliche Nachweise über deren erfolgte Synthese und im Vergleich mit den anderen Medien meist die stärkste Matrixsynthese, was sich insgesamt ebenfalls in der gegenüber den anderen Medien erhöhten Genexpression für ACAN, COL1A1, COL2A1 und COL10A1 widerspiegelte. Der Zeitpunkt nach 6 Wochen der COL10A1-Genexpression im Vergleich zwischen BM und NH sowie CDM und NH kann hierbei als höchstsignifikant bzw. hochsignifikant gewertet werden.

Die bereits nach 2 Wochen verhältnismäßig auffallend ausgeprägte Zellschichtdicke könnte die gegenseitige Stimulation der Zellen auf den pNSC-Scaffolds im NH-Medium im Sinne einer verstärkten Zellteilung bzw. Proliferation und somit eines positiven Regelkreises begünstigt haben, die u. a. Einfluss auf die Zellen, sowohl auf Ebene der Genexpression, als auch der Synthese der Matrixbestandteile, ausgeübt haben dürfte. Das rasante Zellwachstum und die

damit verbundene größere Zelldichte könnte also die rasche Differenzierung der Zellen in eine chondrogene Ausrichtung hervorgerufen haben (Vickers et al. 2006). Schulze-Tanzil et al. hatten gezeigt, dass dedifferenzierte Chondrozyten, die von einer Monolayer-Kultur in eine Zellkultur hoher Dichte überführt wurden, ihren Chondrozyten-Phänotyp wiedererlangten und in der Folge die Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglykanen nachgewiesen werden konnte (Schulze-Tanzil et al. 2002). Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass nicht nur die ACAN- und COL2A1-, sondern auch die COL1A1- und COL10A1-Genexpression der CPC in den pNSC-Scaffolds im NH-Medium vergleichsweise überwiegend stark erhöht ausfiel. Dies gibt Grund zur Annahme, dass durch die im NH-Medium enthaltenen Zusätze in ihrer Kombination (L-Ascorbinsäure, evtl. DMEM High glucose, TGF-β1 bzw. -3 etc.) eine Überstimulation der CPC bewirkt haben könnten. Nach 6 Wochen fiel die COL1A1-Genexpression ab, bei simultan deutlich steigender COL2A1-, ACAN- und gegenüber dem Ausgangswert ca. 9,5-fach erhöhter COL10A1-Genexpression, was eine eindeutige Zuordnung/Klassifikation der urspünglichen CPC erschwert, im Falle des Letzteren aber den höchsten Grad der Zellhypertrophie gegenüber den Zellen der anderen Medien bedeutete. Eine definitive Aussage über das verwendete NH-Medium selbst bzw. dessen Wirkungsweise, die konkretere Rückschlüsse über den Nährstoffbedarf der Zellen ermöglicht hätten, war durch die Unkenntnis der detaillierten Zusammensetzung erschwert.

Wie in der Diskussion der Migration bereits erwähnten weiteren Arbeit (Schwarz et al. 2012), in der zum unmittelbaren Vergleich von nsCPC und hCh diese auf pNSC-Scaffolds besiedelt und in NH-Medium kultiviert worden waren, sind auch verschiedene Parameter zum Nachweis einer erfolgten Matrixsynthese bestimmt worden, die die Resultate dieser Arbeit größtenteils unterstützen (s. u.): Hier wurde mittels der Alcianblaufärbung sowohl in den mit nsCPC, als auch hCh besiedelten im NH-Medium inkubierten Scaffolds durch im oberflächlichen Bereich der Scaffolds und der Zellschicht die deutliche Proteoglykansynthese nachgewiesen. Die sich im Zeitverlauf steigernde Ablagerung von Proteoglykanen ließ sich vom 14. bis 42. Tag nach Inkubation (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Schwarz et

al. 2012), insbesondere entlang der vermeintlich durch die Zellen gebildeten Kanäle (Schwarz et al. 2012), feststellen. Eine Ausbreitung der Proteoglykane in tiefere Zonen der Scaffolds war bis zum 42. Tag erfolgt (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Schwarz et al. 2012). Diese Beobachtungen lassen sich mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen insbesondere der im NH-Medium, bzgl. der Histologie jedoch versuchsabhängig auch mit den im CDM-Medium inkubierten Scaffolds gut vereinbaren. Ausgenommen von den Beobachtungen der Matrixsynthese blieben über den gesamten Zeitraum die im BM-kultivierten hCh-besiedelten Scaffolds, die kaum eine EZM-Neusynthese und Proteoglykan-Akkumulation demonstrierten (Schwarz & et al. 2012) und somit die Resultate dieser Arbeit medienabhängig histologisch stützen.

Seol et al. zeigten bei CPC im Vergleich zu Chondrozyten neben der Überexprimierung bestimmter Gene für die Migration (siehe 4.2.2), wie oben bzgl. der Matrixsynthese im CDM kurz erwähnt, eine Unterexprimierung von Knorpelmatrix-Genen (Seol et al. 2012). Die durch nsCPC erfolgte Matrixsynthese innerhalb der im NH-Medium kultivierten Scaffolds (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014) deutet darauf hin, dass an dieser Stelle Wachstumsfaktoren die entscheidenden Impulse zur EZM-Synthese gegeben haben könnten, was sich auch durch die unten beschriebenen Färbungen und Genexpression weiterer Matrixbestandteile und damit auch die Ergebnisse dieser Arbeit stützt: Zusätzlich zeigte die durchgeführte Immunhistologie gegen Aggrekan bei beiden eingesetzten Zellarten eine erhöhte Aggrekan-Ablagerung und damit erfolgte sichtbare Aggrekan-Neusynthese vom 14. bis 42. Tag, sowie auch hier die weitere Ausbreitung in die Tiefe des jew. pNSC-Scaffolds (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Schwarz et al. 2012). Hierbei ließ die Intensität der Färbung entlang der Kanäle und in direkter Zellumgebung einen deutlichen Überschuss an Aggrekan der hCh gegenüber den nsCPC vermuten. Schwarz et al. bestätigen mittels signifikanten Aggrekan-Expressionsanstiegs der hCh-besiedelten Scaffolds in im Verlauf bis Tag 42 die Beobachtungen in der Histologie (Schwarz et al. 2012). Die

Ergebnisse der o.g. Arbeitsgruppen lassen trotz in dieser Arbeit nicht erfolgter Aggrekan-Immunhistologie eine auch hier ebenfalls erfolgte Aggrekan-Synthese, insbesondere in den Scaffolds des NH-Mediums, vermuten.

In den o.g. Arbeitsgruppen war auch in der Immunhistologie gegen Kollagen Typ I ab dem 14. Tag innerhalb der Zellschicht der hCh und nsCPC („tight layer“) auf der Scaffoldoberfläche eine sich bis zum 42. Tag erhöhende Menge an Kollagen Typ I erkennbar, wobei nsCPC signifikant mehr Kollagen Typ I als hCh synthetisierten, was einer geringeren Differenzierung der (ns)CPC verglichen mit hCh entspricht (Schulze-Tanzil et al. 2002). Wie in dieser Arbeit im Ergebnisteil bzgl. der Kollagen-Typ-I-Immunhistologie der mit CPC besiedelten Scaffolds im NH bereits beschrieben, konnte auch hier zu allen Zeitpunkten (2, 4 und 6 Wochen) eine deutliche Kollagen-I-Synthese bemerkt werden, die mengenmäßig im NH-Medium überwog und sich auch in der Kollagen-Typ-I-Genexpression im Vergleich zu BM und CDM stärker zeigte. Schwarz et al. zeigten in der Kollagen-I-Immunhistologie wiederum, dass die im NH-Medium inkubierten hCh-besiedelten Scaffolds bis Tag 14 kein bzw. bis Tag 28 wenig Kollagen Typ I aufwiesen, welches sich bis Tag 42 wieder zurückgebildet hatte, was anschließend durch die Genexpression für Kollagen Typ I tendenziell bestätigt wurde und möglicherweise auf die verstärkte Expression von MMPs, wie MMP-2 und -9, zurückzuführen ist (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Koelling et al. 2009, Galasso et al. 2012, Duerr et al. 2004). Da Kollagen Typ I ein Maß für den Differenzierungsstatus von Chondrozyten darstellt und ein hohes Level an Kollagen Typ I ein geringes chondrogenes Differenzierungsstadium bedeutet (Schulze-Tanzil et al. 2002), sind (ns)CPC gegenüber hCh in einem geringeren chondrogenen Differenzierungsstadium. Auch bzgl. der Kollagen-Typ-II-Synthese präsentierten sich die nsCPC gegenüber den hCh in o.g. Arbeitsgruppen ungünstiger, da (ns)CPC aufgrund ihres Phänotyps zeitlich verzögert mit der Synthese bzw. Expression von Kollagen Typ II begannen (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, Schwarz et al. 2012). Eine verzögerte Kollagen-Typ-II-Expression und -Synthese lässt sich in dieser Arbeit sowohl in BM,

versuchsabhängig in CDM, als auch deutlich stärker und konstanter in NH erkennen.

4.4 Eignung von CPC und pNSC für die Rekonstruktion von Knorpeldefekten im Gelenkbereich – ein Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendeten CPC scheinen möglicherweise eine geeignete Zellpopulation für weitere Untersuchungen im Bereich des Tissue Engineering zu sein. Dies liegt mitunter darin begründet, dass ungefähr ein Drittel frisch kultivierter Chondrozyten zwar frei beweglich, jedoch im Vergleich zu anderen Zellarten langsamer in ihrer Geschwindigkeit sind (Morales 2007). Bspw. war die Expression Matrix-degradierender Enzyme wie MMP-1, -3, -9, -14 und ADAMTS-4 gegenüber CPC herabreguliert (Koelling et al. 2009), was bzgl. der Migrationseigenschaften von Nachteil ist. Die ausgeprägte Zellmigration der CPC, wurde auch an anderer Stelle bereits geschildert (Joos et al. 2013), wobei gezeigt werden konnte, dass durch von traumatisiertem Knorpel freigesetzte Faktoren und die Zugabe von Wachstumsfaktoren (*platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), *insulin-like growth factor* (IGF-1)) eine signifikante Steigerung der migrierten CPC erreicht werden konnte. Allerdings wurde dieser Effekt mit TNF-α oder IL-1β wieder zunichte gemacht. In einem Scratch Assay, i.e. Wundheilungsassay in einer verletzungssimulierenden Umgebung, zeigten Joos et al., dass die CPC in der Lage waren, innerhalb von 48 h eine entstandene Lücke wieder zu schließen. Allerdings setzte auch hier die Zugabe von TNF-α und IL-1β, die in der Synovialflüssigkeit nach Trauma erhöht gefunden wurden (Irie et al. 2003), die Zellmigration fast außer Kraft (Joos et al. 2013), sodass die Einleitung einer anti-inflammatorischen Therapie sich zukünftig als hilfreich erweisen könnte, um das regenerative Potential der CPC zu verbessern (Gerter et al. 2012). Im unmittelbaren Vergleich von nsCPC und hCh nach erfolgter Besiedlung auf pNSC-Scaffolds migrierten nsCPC früher und verbreiteten sich weitläufiger als hCh (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014, 4.2.2 Migration) und waren auch in durchgeführten Transwell Chemotaxis Assays verglichen mit normalen

Chondrozyten insgesamt signifikant die aktivere Zellart (Seol et al. 2012). Seol et al. demonstrierten außerdem ein schnelles Wachstum der CPC in Kultur sowie deren Proliferation auf der Knorpeloberfläche, die mit der Überexprimierung Kolonie-stimulierender Faktoren (PRG4), Cyclinen (B1, D1) und weiteren wachstumsbezogenen Genen (FLK-1) übereinstimmt (Seol et al. 2012).
Bosnakovski et al. hatten MSC von Kälbern in chondrogenem Medium mit TGF-β1 in einer Kollagen-Typ-II-Matrix kultiviert und im zeitlichen Verlauf neu exprimierte bzw. synthetisierte Matrixbestandteile wie Kollagen Typ I, II und Aggrekan beobachtet (Bosnakovski et al. 2006). In Abhängigkeit der Zeit war die Expression der chondrogenen Marker Kollagen Typ II und Aggrekan (Wolff et al. 1992), Kollagen Typ X, assoziiert mit hypertrophem Knorpel (Barry et al. 2001), sowie der Dedifferenzierungsmarker Kollagen Typ I (Schulze-Tanzil et al. 2002) bestimmt worden. Kollagen Typ II zeigte sich hochreguliert, Aggrekan und Kollagen Typ X wurden stark exprimiert, wohingegen sich die Kollagen-Typ-I-Expression in Abhängigkeit der Zeit reduzierte (Bosnakovski et al. 2006), was insbesondere Parallelen zu den CPC in BM und NH dieser Arbeit aufweist. Zudem wurde bei den MSC insgesamt eine 17- bzw. 6,9-fache geringere ACAN- und COL2A1-Expression, i.e. Expression von Chondrozytenmarkern (Wolff et al. 1992), als bei mutmaßlichen CPC festgestellt (Seol et al. 2012), sowie die im unmittelbaren Vergleich der MSC mit hCh und nsCPC im Allgemeinen schwächere Differenzierung der MSC (persönliche Mitteilung durch Alexander Elsässer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Ulm 2014). In der Folge ist die größte Einschränkung der MSC zusammenfassend die Anreicherung einer gegenüber Chondrozyten minderwertigen Matrix (Kock et al. 2012) und die hierdurch bedingten verminderten mechanischen Eigenschaften MSC-besiedelter Konstrukte gegenüber den mit Chondrozyten-besiedelten (Erickson et al. 2009, Mauck et al. 2007, Thorpe et al. 2010, Vinardell et al. 2010), deren Ursache die durch während der *In-vitro*-Kultur erhöhte Kollagen-Typ-X-Expression der MSC sein könnte. Koelling et al. hatten CPC nach 3 Wochen *in vitro* in eine 3D-Alginate-Kultur transferiert, wo sie die Wiedererlangung eines runden, Chondrozyten-ähnlichen Phänotyps, die Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression und -Synthese, ein hohes Level an SOX-9, einen zentralen chondrogenen

Transkriptionsfaktor, sowie ein niedriges Level an *runt-related transcription factor 2* (RUNX-2), einen zentralen osteogenen Transkriptionsfaktor, und Kollagen Typ I zeigten. Dies demonstrierte einen positiven Einfluss einer 3D-Umgebung, insbesondere das Wachstum von CPC auf humanem Kollagen Typ II, auf die chondrogene Stimulation der CPC (Koelling et al. 2009), wohingegen das gleiche Experiment mit immortalisierten fetalen sowie isolierten gesunden Chondrozyten keine Differenzierung und ein frühes Absterben erkennen ließ (Koelling et al. 2009). Seol et al. hatten zwar gezeigt, dass u. a. die Knorpelmatrixkomponenten COL10A1, COL2A1 und ACAN eine der am meisten herabregulierten Gene der CPC darstellten, jedoch im Vergleich mit den MSC den oberflächlichen Chondrozytenmarker PRG4 (Lubricin) und Chondrozyten-assoziierte Gene wie S100A1 und S100B (Wolff et al. 1992) überexprimierten und eine weitaus größere ACAN- und COL2A1-Expression als MSC demonstrierten (Seol et al. 2012). Die Heterogenität der CPC, die bereits u. a. bzgl. der Matrixsynthese der CPC-besiedelten pNSC-Scaffolds im CDM beobachtet und beschrieben wurde, beeinflusst das Differenzierungspotential (Koelling et al. 2009). Koelling et al. Ergebnisse zeigten aber insgesamt, dass die CPC lebensfähige und geeignete Zellen der chondrogenen Abstammungslinie darstellen, insbesondere, wenn diese auf einer 3D-Kollagen-Typ-II-Matrix wachsen (Koelling et al. 2009). Außerdem bieten CPC neue Ansätze, ohne Perforation des subchondralen Knochens Zellen in Knorpeldefekte zu rekrutieren und dadurch die endogene Heilung geschädigten Knorpelgewebes zu unterstützen (Joos et al. 2013), wenngleich deren Rekrutierung nach Trauma *in vivo* herabgesetzt zu sein scheint (Milentijevic et al. 2005). Es bleibt also nach wie vor, die genauen Prozesse bei Knorpelschädigung und –defekt herauszufinden und besser zu verstehen, um die optimalen Bedingungen für CPC in einer ausgesuchten Matrix anzupassen. Eine Überlegung wäre, die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu optimieren, sowie einen RUNX-2-Knockdown oder eine anti-inflammatorische Therapie einzuleiten, um das regenerative Potential zu verbessern (Gerter et al. 2012). Durch die Zugabe von *basic fibroblast growth factor* (bFGF) bei Chondrozyten zeigten diese u. a. eine erhöhte Tendenz zur Adhäsion an Kollagen Typ II (Schmal et al. 2006), sodass die Verwendung dieses Wachstumsfaktors auch bei CPC in Erwägung gezogen

werden könnte. Schließlich ist noch zu zeigen, dass die CPC nach Besiedlung der Scaffolds eine EZM synthetisieren, die Knorpel-ähnlich ist und einen höheren physischen Widerstand leistet als der Bindegewebsknorpel der sich nach einer Anbohrung durch austretendes Knochenmark bildet (Pridie 1955, Koelling et al. 2009).

Schwarz et al. hatten sich mit der genaueren Charakterisierung der pNSC-Scaffolds befasst und gezeigt, dass die Matrix durch den durchgeführten Dezellularisierungs- und Sterilisierungsprozess (DP) steril, erregerfrei, nicht zytotoxisch ist, einen geringen GAG-Gehalt hat, welcher potentiell die Biokompatibilität erhöht (Barbosa et al. 2003, Badylak 2008, Turnbull et al. 2001), eine Porengröße nahe dem ursprünglichen pNSC-Knorpel, keinen signifikanten Einfluss auf Zellwachstum und -metabolismus und ein fast intaktes Kollagennetzwerk mit hoher mechanischer Stabilität und Härte mit ursprünglicher Form und Größe aufweist (Schwarz et al. 2012). Schmal et al. hatten eine signifikant gesteigerte Zellproliferation von Chondrozyten u. a. bei Anlagerung an Kollagen Typ II gezeigt (Schmal et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die schon von Schwarz et al. beschriebenen Eigenschaften der pNSC. Es konnte beobachtet werden, dass Chondrozyten in den Scaffolds medienabhängig proliferierten und in der Lage waren, eine Matrix zu synthetisieren. Diese Charakteristika belegen deren Eignung für eine Rezellularisierung durch gewebeständige CPC. Nehrer et al., die sich mit der Besiedlung von soliden Kollagen-Typ-I- und -II-Matrizes mit Chondrozyten befassten, beobachteten an dieser Stelle zu jedem bestimmten Zeitpunkt eine signifikant höhere Prozentzahl an Zellen mit sphärischer, i.e. chondrozytischer Morphologie und insgesamt eine größere biosynthetische Aktivität bzgl. Proteoglykanen und Kollagen Typ II, verglichen mit einer Kollagen-Typ-I-Matrix (Nehrer et al. 1997). Ähnliche Beobachtungen wurden auch zum späteren Zeitpunkt gemacht, als Kollagen-II-Matrizes mit Alginat und einer Kollagen-I-EZM ebenfalls bzgl. ihres Einflusses auf die Zellmorphologie und chondrogenes Expressionsmuster untereinander verglichen wurden. Bosnakovski et al. konnten zeigen, dass die Kollagen-II-Matrix insgesamt das Potential hatte, die MSC-Chondrogenese zu stimulieren und aufrechtzuerhalten (Bosnakovski et al. 2006),

sodass der Einsatz dieser Matrix in der Zukunft des Tissue Engineerings auch mit der Besiedlung weiterer Zellarten gerechtfertigt erscheint. *In vivo* hatten Breinan et al. gezeigt, dass sich die Mehrheit des Reparationsgewebes der u. a. mit Chondrozyten besiedelten Kollagen-Typ-II-Matrizes *in vivo* nach 15 Wochen bildete (Breinan et al. 2000), sodass man bei Fortsetzung dieser Arbeit den zu untersuchenden Zeitraum ausdehnen müsste, um ein besser sichtbares Ergebnis durch Matrixbildung zu gewährleisten. Desweiteren haben andere Forschungsgruppen vom förderlichen Effekt von Schubspannung (Freed et al. 1998) und Druckkräften (Davisson et al. 2002, Mauck et al. 2000, Angele et al. 2004) während der Kultur verschiedener Materialien für das Tissue Engineering des Gelenkknorpels berichtet, die ebenfalls auch im Falle der Kollagen-II-Matrizes eine weitere Anregung für eine Optimierung des Versuchsaufbaus darstellen. Durch Änderung der Steifigkeit der Matrix wurde außerdem gezeigt, dass die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen beeinflusst wurde (Pei et al. 2011, Saha et al. 2008, Leipzig & Shoichet 2009), sodass eine weitere Anpassung/Optimierung der Steifigkeit der pNSC-Scaffolds womöglich auf positiven Einfluss auf CPC haben könnte. Durch die Verwendung des durch den Dezellularisierungs-/Sterilisierungsprozess (DP) behandelten xenogenen Gewebes (Breiter 2010b, Breiter 2010a) werden Probleme, wie begrenzte Verfügbarkeit und Morbidität des Spenders von geringer Bedeutung sein. Zudem ist die Gefahr der Erreger-/Krankheitsübertragung und Immunreaktionen deutlich gemildert (Schwarz et al. 2012). Ein weiterer Vorteil der pNSC-Scaffolds für eventuelle spätere *In-vivo*- Modelle stellt außerdem deren mögliche Anpassbarkeit ihrer Form und Größe und damit speziell auf den jeweiligen Knorpeldefekt dar.

5 Zusammenfassung

Durch die weltweite Relevanz fokaler Knorpeldefekte und deren langfristig limitierten erfolgversprechenden Therapieoptionen nimmt der Bereich der *In-situ*-Regeneration zur alternativen Behandlung eine besondere Rolle ein. Das Thema und Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Kollagen-Typ-II-Matrizes aus Schweinenasenseptum bzgl. der Einwanderung von Vorläuferzellen aus dem humanen Knorpel. Ausschlaggebend war die Hypothese, dass es im Gelenkknorpel eine Zellpopulation, chondrogene Progenitorzellen (CPC), gibt, die bei Schädigung des Knorpels für die *In-situ*-Regeneration rekrutiert werden könnten. Dabei wurde geprüft, ob diese tatsächlich die Eigenschaft haben, in eine geeignete Matrix einzuwandern, sich chondrogen zu differenzieren und eine knorpeltypische Matrix zu bilden. Es sollte die Eignung der verwendeten Kollagen-Typ-II-Matrix (porcine nasal septum cartilage (pNSC-)Scaffolds) und CPC im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen *in vivo* eruiert werden. Für diese Fragestellung wurden die mit CPC besiedelten pNSC-Scaffolds 2, 4 und 6 Wochen lang in je 3 Medien – Basalmedium (BM), chondrogenes Differenzierungsmedium (CDM) und nichthämatogenes Differenzierungsmedium (NH) - kultiviert und dann histologisch (Alcianblaufärbungen, Safranin-O, Immunhistologie Kollagene Typ I, II und X) und auf Ebene der Genexpression (Aggrekan (ACAN), Kollagen Typ I (COL1A1), Kollagen Typ II (COL2A1) und Kollagen Typ X (COL10A1)) analysiert. Zudem wurden die Zellschichtbildung und Rezellularisierung durch Zellmigration bestimmt. Die Matrix der pNSC-Scaffolds wurde hierbei erfolgreich rezellularisiert, was sich in der Zellproliferation/-schichtbildung zeigte. In NH bildete sich im Zeitverlauf die dickste Zellschicht bei ausgeprägter Migration, in BM die dünnste Zellschicht bei tiefer Migration. Versuchsabhängig zeigte sich in CDM eine ausgeprägte bzw. mäßige Zellproliferation/-schichtbildung und vergleichsweise wenig Migration. Die stärkste Genexpression und größte Matrixsynthese aller ermittelten Gene bzw. Proteine erfolgte durch die Zellen der in NH-Medium inkubierten pNSC-Scaffolds. Die Genexpression der chondrogenen Differenzierungsmarker ACAN und COL2A1 war im Verlauf steigend und nach 6 Wochen im Vergleich zum CDM hochsignifikant. Ähnlich zeigte sich auch die Genexpression von COL10A1, wobei der Zeitpunkt nach 6 Wochen im Vergleich zum CDM und BM hoch- bzw. höchstsignifi-

kant war. Im BM zeigte sich eine beginnende chondrogene Differenzierung mit steigender Genexpression von ACAN und COL2A1 und Herabregulation der Hypertrophiemarker COL1A1 und COL10A1. Dies spiegelte sich histologisch jedoch nicht wesentlich in der Synthese von Matrixkomponenten wider. Die Zellen im CDM zeigten versuchsabhängig variable Ergebnisse. Durchschnittlich war die ACAN- und COL2A1-Genexpression am niedrigsten, die COL1A1-Genexpression war herabreguliert und die COL10A1-Genexpression sank im Verlauf. Versuchsabhängig konnte in 2 Versuchsdurchläufen kaum Kollagen Typ II- und Proteoglykan-Synthese beobachtet werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurde bei allen histologisch bestimmten Matrixkomponenten eine deutliche Synthese festgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die *in vitro* insbesondere in den pNSC-Scaffolds des NH-Mediums vielversprechende Ansätze demonstrierten, sind auch für weitere Forschungen auf dem Gebiet der *In-situ*-Regeneration des Gelenkknorpels mit (CPC-)besiedelten Kollagen-Typ-II-Matrizes interessant. Weitere Ansätze sollten ggf. einen längeren Zeitraum umfassen. Insgesamt überschneiden sich die Resultate besonders des NH-Mediums bzgl. der Matrixsynthese mit der Literatur und erlauben Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der Resultate. Die CPC weisen aufgrund ihrer Eigenschaften gegenüber mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Chondrozyten Vorteile auf: Stammzell-Charakteristika wie Klonogenität, Multipotenz, migratorische Aktivität, ein hohes chondrogenes Potential und die Präsenz der CPC u. a. in oberflächlichen Knorpelzonen. Dies ermöglicht die Rekrutierung von Zellen in Knorpeldefekte ohne Perforation des subchondralen Knochens und dadurch die endogene Heilung geschädigten Knorpelgewebes. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine dezellularisierte Kollagen-Typ-II-Matrix aus Schweinenasenseptum mit CPC aus humanem Knorpel rezellularisiert werden kann. Die CPC synthetisierten abhängig vom Kultivierungsmedium knorpeltypische Matrixkomponenten. Ein endgültiges Fazit über die CPC und pNSC-Scaffolds in Hinblick auf ihre Eignung in der *In-situ*-Regeneration des Gelenkkorpels ist allerdings aufgrund der *In vitro*-Versuche dieser Arbeit nicht möglich. Das anvisierte Ziel wäre, die dezellularisierte Matrix in einem *In-vivo*-Modell zellfrei zu transplantieren und über eine endogene Repopulation u. a. von CPC aus benachbartem Knorpel eine *In-situ*-Regeneration zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P: Kapitel 19: Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. In: Anderson M, Granum S (Hrsg.), Molecular Biology of the Cell. 5. Auflage, Garland Science, Taylor & Francis, New York (USA), S. 1182 (2008)
2. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M: Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Arthritis and Rheumatism, 50:1522–1532 (2004)
3. Andrades J A, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall F L, Nimni M E: A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. Experimental Cell Research, 250:485–498 (1999)
4. Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R: Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. Biomaterials, 25:2831–2841 (2004)
5. Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Füchtmeier B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R: Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. Biorheology, 41:335–346 (2004)
6. Asanbaeva A, Masuda K, Thonar E J, Klisch S M, Sah, R L: Mechanisms of cartilage growth: modulation of balance between proteoglycan and collagen in vitro using chondroitinase ABC. Arthritis and Rheumatism, 56:188–198 (2007)
7. Awad H A, Halvorsen Y D, Gimble J M, Guilak F: Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. Tissue Engineering, 9:1301–1312 (2003)
8. Badylak S F: The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Seminars in Cell & Developmental Biology, 13:377–383 (2002)
9. Badylak S F: Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Transplant Immunology, 12:367–377 (2004)
10. Badylak S F: Kapitel 21: Biologic Scaffold Materials for Orthopaedic Soft Tissue Reconstruction. In: Pietrzak W S (Hrsg.), Musculoskeletal Tissue Regeneration: Biological Materials and Methods, Orthopedic Biology and Medicine. Springer Science & Business Media, Berlin, Heidelberg, New York, S. 443–457 (2008)
11. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle J-P, Martelly I, Papy-García D : Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. Glycobiology, 13:647–653 (2003)
12. Barry F, Boynton R E, Liu B, Murphy J M: Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene

expression of matrix components. Experimental Cell Research, 268:189–200 (2001)
13. Bartlett W, Gooding C R, Carrington R W, Skinner J A, Briggs T W, Bentley G: Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A Preliminary Report. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, 87:330–332 (2005)
14. Bartlett W, Skinner J A, Gooding C R, Carrington R W, Flanagan A M, Briggs T W, Bentley G: Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A prospective, randomised study. [Miscellaneous Article]. Journal of Bone & Joint Surgery - British Volume, 87:640–645 (2005)
15. Bauman P A, Lawrence L A, Biesert L, Dichtelmüller H, Fabbrizzi F, Gajardo R, Gröner A, Jorquera J I, Kempf C, Kreil T R, von Hoegen I, Pifat D Y, Petteway S R Jr, Cai K: Critical factors influencing prion inactivation by sodium hydroxide. Vox Sanguinis, 91:34–40 (2006)
16. Becher G, Winsel K: Short Scientific report: Vitamin C lessens superoxide anion(O2)-induced bronchial constriction. Zeitschrift für Erkrankung der Atmungsorgane, 173:100–104 (1989)
17. Benders K E, van Weeren P R, Badylak S F, Saris D B, Dhert W J, Malda J: Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. Trends in Biotechnology, 31:169–76 (2013)
18. Benthien J P, Behrens P: Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): a one step procedure for retropatellar articular resurfacing. Acta Orthopædica Belgica, 76:260-263 (2010)
19. Benthien J P, Behrens P: The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis AMIC: method description and recent developments. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 19:1316-1319 (2011)
20. Borovec S, Broumis C, Adcock W, Fang R, Uren E: Inactivation kinetics of model and relevant blood-borne viruses by treatment with sodium hydroxide and heat. Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization, 26:237–244 (1998)
21. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T: Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. Biotechnology and Bioengineering, 93:1152–1163 (2006)
22. Breinan H A, Martin S D, Hsu H P, Spector M: Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 18:781–9 (2000)
23. Breiter: Collagen implant. Patent Application EP2411453 A1 (2010a)
24. Breiter: Collagen implant. Patent Application WO/2010/108945 (2010b)

25. Brenner R E, Fiedler J: Migration of Local Progenitor Cells as Therapeutic Target in Knee Osteoarthritis. Current Rheumatology Reviews, 4:171–174 (2008)
26. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. The New England Journal of Medicine, 331:889-95 (1994)
27. Buckwalter J A, Mankin H J: Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instructional Course Lectures, 47:487–504 (1998)
28. Buckwalter J A, Roughley P J, Rosenberg L C: Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. Microscopy Research and Technique, 28:398–408 (1994)
29. Burdick J A, Chung C, Jia X, Randolph M A, Langer R: Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. Biomacromolecules., 6:386–391 (2005)
30. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T: The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. Journal of Biomedical Materials Research, 67:1170–1180 (2003)
31. Chia S H, Schumacher B L, Klein T J, Thonar E J, Masuda K, Sah R L, Watson D: Tissue-engineered human nasal septal cartilage using the alginate-recovered-chondrocyte method. The Laryngoscope, 114:38–45 (2004)
32. Chung C, Mesa J, Randolph M A, Yaremchuk M, Burdick J A: Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 77:518–525 (2006)
33. Cucchiarini M, Madry H, Guilak F, Saris D B, Stoddart M J, Koon Wong M, Roughley P: A vision on the future of articular cartilage repair. European Cells & Materials, 27:12-6 (2014)
34. Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A: Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. Journal of Orthopaedic Research, 20:842–848 (2002)
35. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten F P: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis and Rheumatism, 44:1928–1942 (2001)
36. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten F: Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. Arthritis and Rheumatism, 50:142–150 (2004)
37. Dirschl D R, Marsh J L, Buckwalter J A, Gelberman R, Olson S A, Brown T D, Llinias A: Articular fractures. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 12:416–423 (2004)
38. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E: Minimal criteria for defining

multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8:315–317 (2006)
39. Duda G N, Haisch A, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann J E, Sittinger M: Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. Journal of Biomedical Materials Research, 53:673–7 (2000)
40. Dudhia J: Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. Cellular and Molecular Life Sciences, 62:2241-56 (2005)
41. Duerr S, Stremme S, Soeder S, Bau B, Aigner T: MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. Clinical and Experimental Rheumatology, 22:603–8 (2004)
42. Erickson I E, Huang A H, Chung C, Li R T, Burdick J A, Mauck R L: Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. Tissue Engineering. Part A, 15:1041–1052 (2009)
43. Ernst D R, Race R E: Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. Journal of Virological Methods, 41:193–201 (1993)
44. Felson D T: Clinical Practice. Osteoarthritis of the knee. The New England Journal of Medicine, 354:841–848 (2006)
45. Fickert S, Fiedler J, Brenner R E: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Research & Therapy, 6:R422–32 (2004)
46. Fosang A J, Neame P J, Last K, Hardingham T E, Murphy G, Hamilton J A: The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. The Journal of Biological Chemistry, 267:19470–19474 (1992)
47. Freed L E, Hollander A P, Martin I, Barry J R, Langer R, Vunjak-Novakovic G: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. Experimental Cell Research, 240:58–65 (1998)
48. Friess W: Collagen--biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 45:113–136 (1998)
49. Furman B, Olson S, Guilak F: The development of posttraumatic arthritis after articular fracture. Journal of Orthopaedic Trauma, 20:719–25 (2006)
50. Galasso O, Familiari F, De Gori M, Gasparini G: Recent findings on the role of gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and -9) in osteoarthritis. Advances in Orthopedics. Artikel-ID 834208 (2012)
51. Gannon J M, Walker G, Fischer M, Carpenter R, Thompson R C, Oegema T R: Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 9:485–494 (1991)

52. Gao J, Caplan A I: Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. La Chirurgia degli Organi di Movimento, 88:305–316 (2003)
53. Gerter R, Kruegel J, Miosge N: New insights into cartilage repair - the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology, 31:206–13 (2012)
54. Giandomenico A R, Cerniglia G E, Biaglow J E, Stevens C W, Koch C J: The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. Free Radical Biology & Medicine, 23:426–434 (1997)
55. Gille J, Schuseil E, Wimmer J, Gellissen J, Schulz A P, Behrens P: Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 18:1456-1464 (2010)
56. Gille J, Behrens P, Volpi P, de Girolamo L, Reiss E, Zoch W, Anders S: Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 133:87–93 (2013)
57. Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, von der Mark K: Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. Matrix Biology, 15:231–238 (1996)
58. Glowacki J, Mizuno S: Collagen scaffolds for tissue engineering. Biopolymers, 89:338–44 (2008)
59. Gonçalves A C, Griffiths L G, Anthony R V, Orton E C: Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. The Journal of Heart Valve Disease, 14:212–217 (2005)
60. Gorvy D A, Herrick S E, Shah M, Ferguson M W: Experimental manipulation of transforming growth factor-beta isoforms significantly affects adhesion formation in a murine surgical model. The American Journal of Pathology, 167:1005-19 (2005)
61. Goyal D, Keyhani S, Lee E H, Hui J H: Evidence-based status of microfracture technique: A systematic review of Level I and II studies. Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery, 29:1579–1588 (2013)
62. Gupta M S, Cooper E S, Nicoll S B: Transforming Growth Factor-Beta 3 Stimulates Cartilage Matrix Elaboration by Human Marrow-Derived Stromal Cells Encapsulated in Photocrosslinked Carboxymethylcellulose Hydrogels: Potential for Nucleus Pulposus Replacement. Tissue Engineering. Part A, 17:2903-10 (2011)
63. Hangody L, Rathonyi G K, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L: Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. The Journal of Bone & Joint Surgery, 86-A Suppl: 65-72 (2004)

64. Hardingham T E, Fosang A J: Proteoglycans: many forms and many functions. The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 6:861–870 (1992)
65. Hartmann M, Pabst M A, Dohr G: Kapitel: Stützgewebe > Knorpelgewebe. In: Hartmann M, Pabst M A, Dohr G (Hrsg.) Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas, 5. Auflage, Facultas Universitätsverlag, Wien, S. 38-39 (2010)
66. Hauser K: Teil A VII, Kapitel 16: Vitamine. Teil B II, Kapitel 7: Extrazelluläre Matrix. In: Rassow J Rassow, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg) Duale Reihe Biochemie, 2., aktualisierte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 303-305, 402-406 (2008)
67. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett N R, Crystal R G, Besmer P, Lyden D, Moore M A, Werb Z, Rafii S: Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand. Cell, 109:625–637 (2002)
68. Hiraoka K, Grogan S, Olee T, Lotz M: Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. Biorheology, 43:447–454 (2006)
69. Horton W E Jr, Bennion P, Yang L: Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 6:379–81 (2006)
70. Hotz M A, Speirs A D, Oxland T, Müller M, Hämmerle C, Häusler R: Radiologic and mechanical properties of inactivated ossicle homografts. The Laryngoscope, 109:65–69 (1999)
71. Hoyland J A, Thomas J T, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford R P, Grant M E, Freemont A J: Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. Bone and Mineral, 15:151–163 (1991)
72. Irie T, Aizawa T, Kokubun S: The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. A study in the rabbit. The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume, 87(9):1278–1284 (2005)
73. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H: Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. Knee, 10:93-96 (2003)
74. Jones E A, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, Corscadden D, Chapman T, Emery P, Hatton P, McGonagle D: Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. Arthritis and Rheumatism, 58:1731–1740 (2008)
75. Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner R E: Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. Arthritis Research & Therapy, 15:R119 (2013)
76. Käsermann F, Kempf C: Sodium hydroxide renders the prion protein PrPSc sensitive to proteinase K. The Journal of General Virology, 84:3173–3176 (2003)

77. Kaul G, Cucchiarini M, Remberger K, Kohn D, Madry H: Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 20:2315–2324 (2012)
78. Ke Y, Wu G, Wang Y: PHBV/PAM scaffolds with local oriented structure through UV polymerization for tissue engineering. BioMed Research International, Artikel-ID 157987 (2014)
79. Kirsch T, von der Mark K: Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. European Journal of Biochemistry / FEBS, 196:575–580 (1991)
80. Kock L, Donkelaar C C, Ito K: Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. Cell and Tissue Research, 347:613–627 (2012)
81. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path J R, Sadowski B, Miro X, Miosge N: Migratory Chondrogenic Progenitor Cells from Repair Tissue during the Later Stages of Human Osteoarthritis. Cell Stem Cell, 4:324–335 (2009)
82. Koelling S, Miosge N: Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. Arthritis and Rheumatism, 62:1077–87 (2010)
83. Koga H, Muneta T, Ju Y J, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, von der Mark K, Sekiya I: Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. Stem Cells, 25:689–696 (2007)
84. Kuettner K E: Biochemistry of articular cartilage in health and disease. Clinical Biochemistry, 25:155–163 (1992)
85. Langer R, Vacanti J P: Tissue engineering. Science 260:920-926 (1993)
86. Lavik E, Langer R: Tissue engineering: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 65:1–8 (2004)
87. Lee C H, Singla A, Lee Y: Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics, 221:1–22 (2001)
88. Lee C R, Grodzinsky A J, Hsu H-P, Spector M: Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 21:272–81 (2003)
89. Lefebvre V, Smits P: Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews, 75:200–212 (2005)
90. Leipzig N D, Shoichet M S:The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. Biomaterials, 30:6867–6878 (2009)
91. Li W-J, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson K G, Hall D J, Tuan R S: A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. Biomaterials, 26:599–609 (2005)
92. Lüllmann-Rauch R: Kapitel 8: Binde- und Stützgewebe. In: Lüllmann-Rauch R (Hrsg.), Taschenlehrbuch Histologie. 2., komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S: 120-139 (2006)

93. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J: Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials, 25:2997–3004 (2004)
94. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Khan W S: Evaluation of Biological Protein-Based Collagen Scaffolds in Cartilage and Musculoskeletal Tissue Engineering- A Systematic Review of the Literature. Current Stem Cell Research & Therapy, 7:302–309 (2012)
95. Marreco P R, da Luz Moreira P, Genari S C, Moraes A M: Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials, 71:268–277 (2004)
96. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J P, Roughley P J: Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. Best Practice and Research: Clinical Rheumatology, 22:351–384 (2008)
97. Martin J A, Buckwalter J A: Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. The Iowa Orthopaedic Journal, 21:1–7 (2001)
98. Matsunaga D, Akizuki S, Takizawa T, Yamazaki I, Kuraishi J: Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis. Knee, 14:465–471 (2007)
99. Mauck, R L, Byers B A, Yuan X, Tuan R S: Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 6:113–125 (2007)
100. Mauck R L, Soltz M A, Wang C C, Wong D D, Chao P H, Valhmu W B, Hung C T, Ateshian G A: Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. Journal of Biomechanical Engineering, 122:252–260 (2000)
101. Meaney Murray M, Rice K, Wright R J, Spector M: The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 21:238–244 (2003)
102. Milentijevic D, Rubel I F, Liew A S, Helfet D L, Torzilli P A: (2005). An in vivo rabbit model for cartilage trauma: a preliminary study of the influence of impact stress magnitude on chondrocyte death and matrix damage. Journal of Orthopaedic Trauma, 19:466–473 (2005)
103. Minas T: Chondrocyte implantation in the repair of chondral lesions of the knee: economics and quality of life. The American Journal of Orthopedics, 27:739-44 (1998)
104. Morales T I: Chondrocyte moves: clever strategies? Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 15:861–71 (2007)

105. Mueller M B, Tuan R S: Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Arthritis and Rheumatism, 58:1377–1388 (2008)
106. Müller B, Kohn D: Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method. Der Orthopäde, 28:4–10 (1999)
107. Murphy J M, Fink D J, Hunziker E B, Barry F P: Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. Arthritis and Rheumatism, 48:3464-74 (2003)
108. Nehrer S, Breinan H A, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge C B, Yannas I V, Spector M: Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. Journal of Biomedical Materials Research, 38:95–104 (1997)
109. Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, Behrens P, Bosch U, Erggelet C, Fickert S, Fritz J, Gebhard H, Gelse K, Günther D, Hoburg A, Kasten P, Kolombe T, Madry H, Marlovits S, Meenen N M, Müller P E, Nöth U, Petersen J P, Pietschmann M, Richter W, Rolauffs B, Rhunau K, Schewe B, Steinert A, Steinwachs M R, Welsch G H, Zinser W, Albrecht D: Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Cartilage Defects of the Knee: A Guideline by the Working Group “Tissue Regeneration” of the German Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (DGOU). Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie, 151:38-47 (2013)
110. Niethard F U, Pfeil J, Biberthaler P: Kapitel 4.1: Anatomie und Physiologie des Gelenks. Niethard F U (Hrsg.) Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 172-173 (2014)
111. Nooeaid P, Salih V, Beier J, Boccaccini A: Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. J Cell Mol Med., 16:2247–70 (2012)
112. Nöth U, Osyczka A M, Tuli R, Hickok N J, Danielson K G, Tuan R S: Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. Journal of Orthopaedic Research, 20:1060–1069 (2002)
113. O’Brien F J, Harley B A, Yannas I V, Gibson L J: The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials, 26:433–441 (2005)
114. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume, 84:571–578 (2002)
115. Pei M, Li J T, Shoukry M, Zhang Y: A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. European Cells & Materials, 22:333–43 (2011)
116. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A: Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clinical Orthopaedics and Related Research, (374):212–34 (2000)
117. Peterson L, Vasiliadis H S, Brittberg M, Lindahl A: Autologous Chondrocyte Implantation. A Long-term Follow-up. The American Journal of Sports Medicine, 38:1117-24 (2010)

118. Pridie K H: The development and nature of osteoarthritis of the hip joint. Rheumatism, 11: 2-7 (1955)
119. Richette P, Corvol M, Bardin T: Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. Joint Bone Spine, 70:257–262 (2003)
120. Richter W: Mesenchymal stem cells and cartilage *in situ* regeneration. Journal of Internal Medicine, 266:390-405 (2009)
121. Riesle J, Hollander A P, Langer R, Freed L E, Vunjak-Novakovic, G: Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. Journal of Cellular Biochemistry, 71:313–327 (1998)
122. Roos E M: Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. Current Opinion in Rheumatology, 17:195–200 (2005)
123. Rose F R, Oreffo R O: Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochemical and Biophysical Research Communications, 292:1–7 (2002)
124. Rotter N, Haisch A, Bücheler M: Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology : Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery, 262:539–545 (2005)
125. Rotter N, Bücheler M, Haisch A, Wollenberg B, Lang S: Cartilage tissue engineering using resorbable scaffolds. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1:411–416 (2007)
126. Saeidi N, Sander E A, Ruberti J W: Dynamic shear-influenced collagen self-assembly. Biomaterials, 30:6581–6592 (2009)
127. Saha K, Keung A J, Irwin E F, Li Y, Little L, Schaffer D V, Healy K E: Substrate modulus directs neural stem cell behavior. Biophysical Journal, 95:4426–4438 (2008)
128. Sánchez M, Delgado D, Sánchez P, Fiz N, Azofra J, Orive G, Anitua E, Padilla S: Platelet Rich Plasma and Knee Surgery. BioMed Research International, Artikel-ID 890630 (2014)
129. Schmal H, Mehlhorn A T, Fehrenbach M, Müller C A, Finkenzeller G, Südkamp N P: Regulative mechanisms of chondrocyte adhesion. Tissue Engineering, 12:741–50 (2006)
130. Schünke M: Topografie und Funktion des Bewegungssystems: Funktionelle Anatomie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 22 (2014) (392 S.)
131. Schuh E, Kramer J, Rohwedel J, Notbohm H, Müller R, Gutsmann T, Rotter N: Effect of matrix elasticity on the maintenance of the chondrogenic phenotype. Tissue Engineering. Part A, 16:1281–1290 (2010)
132. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker H J, Scheid A, Shakibaei M: Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. Cell and Tissue Research, 308:371–379 (2002)
133. Schwarz S, Elsaesser A F, Koerber L, Goldberg-Bockhorn E, Seitz A M, Bermueller C, Dürselen L, Ignatius A, Breiter R, Rotter N: Processed xenogenic cartilage as innovative biomatrix for cartilage tissue engineering:

effects on chondrocyte differentiation and function. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 9:E239-51 (2012)
134. Schwarz S, Koerber L, Elsaesser A F, Goldberg-Bockhorn E, Seitz A M, Dürselen L, Ignatius A, Walther P, Breiter R, Rotter N: Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. Tissue Engineering. Part A, 18:2195–209 (2012)
135. Seitz S, Schmidt K, Rüther W: Kapitel 5.1.4: Pathologische Anatomie und Pathophysiologie. In: Hettenkofer H-J, Schneider M, Braun J (Hrsg.) Rheumatologie Diagnostik-Klinik-Therapie, 6., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 318-319 (2014)
136. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, Tsuji K, Miyaguchi K, Ogishima S, Tanaka H, Muneta T: Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 30:943–9 (2012)
137. Seol D, McCabe D J, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter M W, Lehman A D, Ding L, Buckwalter J A, Martin J A: Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. Arthritis and Rheumatism, 64:3626–37 (2012)
138. Simon T M, Jackson D W: Articular cartilage: injury pathways and treatment options. Sports Medicine and Arthroscopy Review, 14:146–154 (2006)
139. Solheim E, Hegna J, Øyen J, Harlem T, Strand T: Results at 10 to 14 years after osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee. The Knee, 20:287–90 (2013)
140. Song E, Yeon Kim S, Chun T, Byun H J, Lee Y M: Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. Biomaterials, 27:2951–2961 (2006)
141. Steadman J R, Rodkey W G, Rodrigo J J: Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. Clinical Orthopaedics and Related Research. (391 Suppl):S362-9 (2001)
142. Steinert A F, Ghivizzani S C, Rethwilm A, Tuan R S, Evans C H, Noth U: Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. Arthritis Research & Therapy, 9:213-27 (2007)
143. Stone K R, Ayala G, Goldstein J, Hurst R, Walgenbach A, Galili U: Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. III. Transplantation of alpha-galactosidase-treated porcine cartilage. Transplantation, 65:1577–1583 (1998)
144. Swiontkowski M F, Chapman J R: Cost and effectiveness issues in care of injured patients. Clinical Orthopaedics and Related Research, 318:17–24 (1995)
145. Taguchi F, Tamai Y, Uchida K, Kitajima R, Kojima H, Kawaguchi T, Ohtani Y, Miura S: Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. Archives of Virology, 119:297–301 (1991)
146. Thorpe S D, Buckley C T, Vinardell T, O'Brien F J, Campbell V A, Kelly D J: The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic

compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation. Annals of Biomedical Engineering, 38:2896–2909 (2010)
147. Tuan R S, Boland G, Tuli R: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Research & Therapy, 5:32–45 (2003)
148. Tudela C, Formoso M A, Martínez T, Pérez R, Aparicio M, Maestro C, Del Río A, Martínez E, Ferguson M, Martínez-Alvarez C: TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. The International Journal of Developmental Biology. 46:333-6 (2002)
149. Tuli R, Li W-J, Tuan R S: Current state of cartilage tissue engineering. Arthritis Research & Therapy, 5:235–238 (2003)
150. Turnbull J, Powell A, Guimond S: Heparan sulfate: Decoding a dynamic multifunctional cell regulator. Trends in Cell Biology, 11:75–82 (2001)
151. Unal A, Thyer J, Uren E, Middleton D, Braun M, Maher D: Investigation by bioassay of the efficacy of sodium hydroxide treatment on the inactivation of mouse-adapted scrapie. Biologicals, 35:161–164 (2007)
152. Vacanti C A, and Vacanti J P: Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. Otolaryngolic Clinics of North America. 27:263-76. (1994)
153. Veilleux N H, Yannas I V, Spector M : Effect of Passage Number and Collagen Type on the Proliferative, Biosynthetic and Contractile Activity of Adult Canine Articular Chondrocytes in Type I and II Collagen-Glycosaminoglycan Matrices in vitro. Tissue Engineering, 10:119–127 (2004)
154. Venugopal J, Ma L L, Yong T, Ramakrishna S: In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. Cell Biology International, 29:861–867 (2005)
155. Vickers S M, Squitieri L S, Spector M: Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: dynamic pore reduction promotes cartilage formation. Tissue Engineering, 12:1345–1355 (2006)
156. Vickery K, Deva A K, Zou J, Kumaradeva P, Bissett L, Cossart Y E: Inactivation of duck hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilization system: Laboratory and “in use” testing. Journal of Hospital Infection, 41:317–322 (1999)
157. Vinardell T, Buckley C T, Thorpe S D, Kelly D J: Composition – function relations of cartilaginous tissues engineered from chondrocytes and mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and infrapatellar fat pad. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 5:673–683 (2010)
158. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H:Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. Arthritis and Rheumatism, 35:806–811 (1992)
159. Wachtler F: Kapitel 5.2: Bauelemente der Interzellulärsubstanz. In: Wachtler F (Hrsg.) Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen, 7., veränderte Auflage, Facultas Universitätsverlag, Wien, S. 127-132 (2005)

160. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M: Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 10:199–206 (2002)
161. Wasiak J, Clar C, Villanueva E. Autologous cartilage implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 3. Art. No.: CD003323. DOI: 10.1002/14651858.CD003323.pub2 (2006)
162. Welsch G H, Mamisch T C, Zak L, Blanke M, Olk A, Marlovits S, Trattnig S: Evaluation of cartilage repair tissue after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using a hyaluronic-based or a collagen-based scaffold with morphological MOCART scoring and biochemical T2 mapping: preliminary results. The American Journal of Sports Medicine, 38:934–942 (2010)
163. Wickham M Q, Erickson G R, Gimble J M, Vail T P, Guilak F: Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clinical Orthopaedics and Related Research, 196–212 (2003)
164. Wolff D A, Stevenson S, Goldberg V M: S-100 protein immunostaining identifies cells expressing a chondrocytic phenotype during articular cartilage repair. Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 10:49–57 (1992)
165. Woolf A D, Pfleger B: Burden of major musculoskeletal conditions. Bulletin of the World Health Organization, 81:646–656 (2003)
166. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, Yang F, Wang S, Xu W, Wang A, Lu S: A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biomaterials, 29:2378-87 (2008)
167. Yang Q, Peng J, Lu S B, Guo Q Y, Zhao B, Zhang L, Wang A Y, Xu W J, Xia Q, Ma X L, Hu Y C, Xu B S: Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. Chinese Medical Journal (Engl), 124:3930–8 (2011)

Danksagung

Die Fertigstellung einer Dissertation ist nie alleine zu bewältigen.
An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. R. Brenner, der mir als mein Doktorvater die Realisierung dieses Themas ermöglichte.
Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. Helga Joos, die mir als meine Betreuerin in sämtlichen Belangen stets zuverlässig und äußerst engagiert zur Seite stand und viel Geduld, Energie sowie Verständnis für mich aufbrachte.
Ich bedanke mich sehr herzlich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Orthopädie am RKU Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen, insbesondere bei Frau Dr. Cathrin Hogrefe, Frau Renate Schubert-Schmitt, Frau Christiane Schulz, Herrn Giovanni Ravalli und Frau Brunhilde Amann für ihre Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen meinerseits, ohne die ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
Ein herzlicher Dank gebührt außerdem dem Labor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Ulm für die Bereitstellung der pNSC-Scaffolds, zudem insbesondere Frau Dr. Silke Schwarz und Herrn Alexander Elsässer für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.
Ein großer Dank gilt Frau Dr. med. Ute Nallinger-Häberle für ihre Empathie, die unermüdliche, ermutigende, wertschätzende Begleitung und mentale Unterstützung in den vergangenen Jahren.
Ich bedanke mich bei Frau Dr. Nina-Emily Hengartner für die Zeit, die sie sich nahm, mit mir über meine Arbeit nachzudenken und die vielen ermutigenden Gespräche.
Ich danke Frau Dr. med. Christine Spreckelsen für ihr immerwährend offenes Ohr, ihren erfrischenden Optimismus, wenn ich nicht an mich geglaubt habe und die Zeit, die sie sich nahm, um diese Arbeit mit mir durchzugehen. Danke für Deine Freundschaft.
Danke an alle nicht namentlich erwähnten Freunde und meine Familie für deren Interesse und immerwährenden Glauben an mich. Ich danke ganz besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung jedweder Art auf meinem Weg zur Ärztin und meinem Bruder Jendrik Schäfer sowie bei Timo Mertens, die mir geduldig bei der Formatierung dieser Arbeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Esther Johanna Schäfer
Geburtsdatum und -ort:	09.09.1987 in Berlin-Zehlendorf

Schulbildung

Grundschule:	Grundschule Norsingen Ehrenkirchen (1994-1996) Wentzinger Grundschule Ehrenstetten (1996-1998)
Weiterführende Schule:	Kreisgymnasium Bad Krozingen (1998-2007)
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,5 (2007)
Aupair-Jahr:	in Neuseeland - Auckland von 08/2007 - 08/2008

Hochschulstudium

Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm:	2008-2015
Erste Ärztliche Prüfung:	Frühjahr 2011
Zweite Ärztliche Prüfung:	Herbst 2014
Praktisches Jahr (PJ):	Uniklinik Ulm, Pflichtwahlfach Pädiatrie
Dritte Ärztliche Prüfung:	Herbst 2015

Famulaturen

Famulatur in der Uniklinik Basel, Abteilung Kinder-/Jugendpsychiatrie	08.08. - 07.09.2011
Famulatur in der Helios-Klinik Müllheim, Abteilung Innere Medizin	29.08. - 28.09.2012
Famulatur in der Allgemeinmedizin-Praxis Dres. Weithöner und Schymanski in Ulm	18.02. - 20.03.2013
Famulatur in der Uniklinik Ulm, Abteilung HNO	11.11. - 24.11.2013

Berufliches

Approbation als Ärztin	21.12.2015
Ärztin in Weiterbildung für die Fachklinik Kardiologie, Pneumologie, Angiologie am Ortenau Klinikum Offenburg-Gengenbach.	seit dem 15.06.2016

Sonstiges

Preisträgerin des Scheffelpreises im Deutsch-Abitur, verliehen durch die Literarische Gesellschaft Karlsruhe.	Juni 2007
Freisemester für den Beginn einer experimentellen Doktorarbeit in der Klinik für Orthopädie am RKU, Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen bei Herrn Prof. Dr. R. Brenner.	März 2012

Kongressbeiträge im Rahmen der Promotion

Helga Joos, Esther Schäfer, Silke Schwarz, Nicole Rotter, Lutz Dürselen, Rolf E. Brenner. Charakterisierung der Besiedlung einer dezellularisierten Matrix aus Schweineknorpel mit humanen chondrogenen Progenitorzellen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgier (DKOU), Berlin 2013: Poster.	2013
Helga Joos, Esther Schäfer, Olga Zimmer, Silke Schwarz, Nicole Rotter, Ludwig Körber, Rolf E. Brenner. Repopulation of a decellularized porcine cartilage	2014

matrix with human chondrogenic progenitor cells. Annual Meeting of the German Society for Matrix Biology in Regensburg, March 20th- 22th 2014: Vortrag und Poster.

Helga Joos, Olga Zimmer, Esther Schäfer, Silke Schwarz, Nicole Rotter, Ludwig Körber, Roman Breiter, Rolf Brenner. Dezellularisierte xenogene Knorpelmatrix zur in situ Regeneration von Knorpeldefekten: In vitro Untersuchungen zur Interaktion mit chondrogenen Progenitorzellen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), Berlin 2015: Poster. 2015