

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen an humanen chondrogenen Progenitorzellen aus späten
Stadien der Osteoarthritis zu dem Migrationspotential und der
Proliferationsfähigkeit ex vivo sowie zu den Auswirkungen einer Kultivierung
in vitro auf das Genexpressionsmuster

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jan Ragnar Path
aus
Rendsburg

Göttingen 2014

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichtstatter/in:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2015

1. EINLEITUNG	1
1.1 Hyaliner Knorpel	1
1.1.1 Bestandteile des Knorpels	1
1.1.1.a Kollagene	2
1.1.1.b Proteoglykane	3
1.1.1.c Glykoproteine und nicht-kollagene Proteine	5
1.1.2 Histologischer Aufbau von hyalinem Knorpel	6
1.1.3 Funktion des Knorpels	9
1.2 Erkrankung des Knorpels - Osteoarthritis	9
1.2.1 Pathogenese der Osteoarthritis	11
1.2.2 Verlauf der Osteoarthritis	14
1.2.3 Therapiekonzepte	16
1.2.3.a Konservative Therapiekonzepte	17
1.2.3.b Operative Therapiekonzepte	17
1.2.3.c Zellbiologische Therapiekonzepte	19
1.3 Zielsetzung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Untersuchtes Gewebe	23
2.2 Methoden der Zellkultur	24
2.2.1 Gewinnung von CPC-Kulturen aus Knorpel	24
2.2.1 Passagieren der Zellen	25
2.3 Transfektion	26
2.3.1 Durchföhren der Transfektion	26
2.3.2 Ermitteln der Transfektionsrate	28
2.3.3 Ermitteln der Transfektionsdauer	28
2.4 Untersuchungen zum Migrationspotential	28
2.4.1 In-vitro-Migrationsassay	28
2.4.2 Ex-vivo-Migration	29
2.4.2.a Entnahme der Stanzzyylinder	30
2.4.2.b Durchföhren der Ex-vivo-Migrationsversuche	31
2.5 Immunfluoreszenzhistochemie	32
2.5.1 Einbettung in Paraffin	33
2.5.2 Anfertigung von Paraffinschnitten	34
2.5.3 Entparaffinieren und Antigendemaskierung	35
2.5.4 Antikörperreaktionen	36
2.5.5 DAPI-Reaktion und Eindecken	36
2.5.6 Kontrollen	37
2.5.7 Auswertung und Migrationstiefenmessung	37

2.6 Molekularbiologische Methoden	38
2.6.1 Isolation von mRNA	38
2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	39
2.6.3 Synthese von cDNA	40
2.6.4 real-time quantitative Polymerase - Kettenreaktion	41
2.6.4.a Durchführung der rt-qPCR	43
2.6.4.b Housekeeping-Gen	43
2.6.4.c Primer	44
2.6.4.d Relative Quantifizierung und statistische Analyse	45
2.7 Materialien	46
2.7.1 Verwendete Chemikalien und Kits	46
2.7.2 Verwendete Geräte, Zellkulturgefäße und Hilfsmittel	48
2.7.3 Lösungen	49
2.7.3.a Ansätze für Phosphatpuffer nach Sørensen	49
2.7.3.b Ansatz für gepuffertes Formalin	49
2.7.3.c Ansätze für PBS-Lösung und 1 %ige (w/v) BSA-PBS-Lösung	49
2.7.4 Verwendete Antikörper	49
3. ERGEBNISSE	50
3.1 Transfektion	50
3.1.1 Transfektionsraten	51
3.1.2 Transfektionsdauer	52
3.2 Migrationspotential	53
3.2.1 Migration in vitro	53
3.2.2 Migration ex vivo	54
3.2.2.a Einwanderungstiefe im G-Knorpel	54
3.2.2.b Einwanderungstiefe im R-Knorpel	57
3.2.2.c Verteilungsmuster im Gewebe	62
3.3 Proliferationsfähigkeit ex vivo	63
3.3.1 Dauer der Proliferationsfähigkeit im G-Knorpel	65
3.3.2 Dauer der Proliferationsfähigkeit im R-Knorpel	66
3.4 Genexpressionsmuster	68
3.4.1 Differenzierungsrichtung in P0	68
3.4.2 Einfluss der Passagen auf die Genexpression	70
3.4.3 Einfluss der Transfektion auf die Genexpression	77
4. DISKUSSION	84
4.1 Migrationspotential	84
4.1.1 Fähigkeit der CPC zur Migration in vitro	85
4.1.2 Fähigkeit der CPC zur Migration ex vivo	87
4.1.3 Vergleich zwischen dem Ex-vivo-Migrationsverhalten in R- und G-Knorpel	92
4.2 Proliferationsfähigkeit ex vivo	94

4.3 Genexpressionsmuster	96
4.3.1 Differenzierungsrichtung in Passage 0	96
4.3.2 Einfluss der Transfektion auf die Genexpression	96
4.3.3 Einfluss der In-vitro-Kultur auf die Genexpression	98
5. ZUSAMMENFASSUNG	102
6. LITERATURVERZEICHNIS	104

ACT	autologe Chondrozytentransplantation
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	chondrogene Progenitorzellen
Ct	<i>cycle threshold</i>
d	Tag(e)
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GFP/maxGFP	<i>green fluorescent protein</i> aus <i>Pontellina plumata</i>
G-Knorpel	makroskopisch noch unauffälliger Knorpelbereich
HKG	Housekeeping-Gen
IgG	Immunglobulin G
IM	interterritoriale Matrix
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger</i> - Ribonukleinsäure
MSC	adulte mesenchymale Stammzellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OA	Osteoarthrose
P0, 1, 2, 3, 4	Passage 0, 1, 2, 3, 4
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PM	perizelluläre Matrix
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
runx 2	Runt-related transcription factor 2
R-Knorpel	Bereich angrenzend an den osteoarthrotischen Hauptdefekt
sek	Sekunde
sox 9	SR \bar{Y} (<i>sex determining region Y</i>)-box 9
Std.	Stunden
TEP	Total-Endoprothese
TGF- β 3	<i>transforming growth factor beta 3</i>
TM	territoriale Matrix
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
rt-qPCR	<i>real-time quantitative</i> Polymerase-Kettenreaktion
UV	ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
95 % K.I.	95 %-Konfidenzintervall

1. Einleitung

1.1 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres und aneurales Bindegewebe, das die Enden von artikulierenden Knochen in Gelenken überzieht (POOLE CA 1997). Durch seine besonderen biomechanischen Eigenschaften ist der hyaline Knorpel in der Lage, sowohl Druck- wie auch Scherkräfte aufzunehmen, diese über dem Gelenk zu verteilen und an den darunter liegenden Knochen weiterzugeben, um so eine freie und schmerzlose Bewegung der Gelenke zu ermöglichen.

1.1.1 Bestandteile des Knorpels

Der hyaline Knorpel besteht aus den Chondrozyten und der von diesen produzierten extrazellulären Matrix (EZM), wobei die Zellen einen Anteil von ca. 10 % und die EZM einen Anteil von etwa 90 % am Knorpelvolumen haben (HARDINGHAM T 1981; STOCKWELL 1983). Da das Knorpelgewebe frei von Gefäßen ist, erfolgen die Versorgung mit Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten durch Diffusion (STOCKWELL 1979). Hierbei müssen die Nährstoffe sowohl durch die Synovialflüssigkeit als auch durch die Knorpelmatrix diffundieren, wodurch die Chondrozyten im Gegensatz zu den Zellen der meisten anderen Gewebe gezwungen sind, mit relativ geringen Sauerstoffkonzentrationen auszukommen (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Diese Umstände führen dazu, dass der hyaline Knorpel ein zellarmes Gewebe ist, wobei sich die Zelldichte umgekehrt proportional zu der Dicke des Knorpels verhält (STOCKWELL 1979).

Die EZM weist einen hohen Wassergehalt auf und besteht aus einem Netzwerk von Kollagenfibrillen, das in ein Gel aus Hyaluronsäure, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen eingebettet ist (MEACHIM und STOCKWELL 1979; POOLE AR 1983). Die Knorpelmatrix schützt die

Chondrozyten während der Bewegung des Gelenkes, indem sie es den Zellen ermöglicht, unter den einwirkenden Kräften ihre Form und Integrität zu bewahren (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Außerdem übermittelt die EZM Signale, die durch die mechanische Belastung der Knorpeloberfläche entstehen, an die Chondrozyten, die dann als Reaktion auf diese Signale die bestehende Matrix modifizieren (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Auch eine Schädigung der EZM hat durch elektrische und physikochemische Signale stimulierende Wirkung auf die Chondrozyten (BUCKWALTER 1995; BUCKWALTER und LANE 1996; GRAY et al. 1988; GRODZINSKY 1993).

Die Chondrozyten im gesunden hyalinen Knorpel eines Erwachsenen weisen keine Mitoseaktivität mehr auf (MANKIN 1963). Jedoch synthetisieren sie beständig Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Proteine (BUCKWALTER und MANKIN 1998a) und erneuern auf diese Weise kontinuierlich die Knorpelmatrix. Mit zunehmendem Alter nehmen die Synthesekapazität für Proteoglykane und die Empfänglichkeit für äußere Stimuli - wie Wachstumsfaktoren - jedoch ab (BUCKWALTER et al. 1993 und 1994a; GUERNE et al. 1995; MARTIN und BUCKWALTER 1996a, 1996b). Diese altersbedingten Veränderungen führen dazu, dass die Chondrozyten nicht mehr in der Lage sind, die Integrität des Knorpelgewebes aufrechtzuerhalten, was wiederum die Entstehung degenerativer Prozesse fördert (MARTIN und BUCKWALTER 1996a).

1.1.1.a Kollagene

Kollagene sind extrazelluläre Proteine, die aus jeweils drei Polypeptidketten, den α -Ketten, aufgebaut sind (MUIR 1995). Diese α -Ketten setzen sich aus spezifischen Tripeptidsequenzen zusammen, die eine linksdrehende Helix bilden (MUIR 1995). Jeweils drei dieser α -Ketten lagern sich nun tauartig zu einer rechtsdrehenden Helix aneinander, die durch Wasserstoffbrücken- und Peptidbindungen stabilisiert wird, und formen so eine Kollagenfibrille (MUIR 1995). Die Kollagene weisen mit 50 - 90 % den größten Anteil am

Trockengewicht des Knorpels auf, wobei dieser Anteil in der oberflächlichen Zone am höchsten ist (MUIR 1995).

Der hyaline Knorpel enthält Kollagen Typ II, Typ VI, Typ IX und Typ XI, wobei Kollagen II die hauptsächlich vorkommende Kollagenart ist (EYRE et al. 1992) und als spezifisch für hyalinen Knorpel und eine chondrozytäre Differenzierung gilt (MUIR 1995). Die Kollagen II- und Kollagen XI-Fasern bilden das fibrilläre Grundgerüst und werden durch Kollagen IX zu einem Geflecht vernetzt (WU et al. 1992). Hierbei liegen die Kollagen XI-Fasern innerhalb der Fibrillen und die Fasern vom Typ IX-Kollagen sind so in die Fibrillenoberfläche integriert, dass Proteoglykane gebunden werden und sich auch andere Matrixmoleküle an das Fibrillennetz anlagern können (EYRE et al. 2006). Dieses Kollagenetzwerk besteht zu 80 - 90 % aus Kollagen Typ II und ist neben den Proteoglykanen hauptverantwortlich für die biomechanische Stabilität des Gelenkknorpels (MILLER 1978), wobei die Kollagene für die Scherfestigkeit sorgen und die Proteoglykane für die Kompressibilität des Knorpels verantwortlich sind (VON DER MARK und GLÜCKERT 1990).

Die Regulation des Durchmessers der Kollagen II-Fibrillen ist abhängig von der Menge an Kollagen IX (WOTTON et al. 1988). Im Bereich des Chondrons ist diese Konzentration besonders hoch, so dass hier die Fibrillen vom Kollagen Typ II einen sehr geringen Durchmesser aufweisen (POOLE CA et al. 1988c, 1997; WOTTON et al. 1991).

Kollagen Typ VI hat nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse der Kollagene im hyalinen Knorpel (EYRE et al. 1992).

1.1.1.b Proteoglykane

Die Proteoglykane sind komplexe Makromoleküle und gliedern sich strukturell in einen zentralen Proteinkern (*core protein*) und verschiedene Glukosaminoglykane, die kovalent an dieses *core protein* gebunden sind (HARDINGHAM T 1981; HARDINGHAM TE et al. 1983; MUIR 1979). Diese chemische Struktur macht die Proteoglykane zu Polyanionen und ist damit

für ihre hohe Wasserbindungsfähigkeit verantwortlich (VON DER MARK und GLÜCKERT 1990). So benötigen diese Moleküle das 30- bis 50fache ihres Trockengewichts als Lösungsvolumen (MUIR 1979), erreichen jedoch im Kollagenetzwerk nur 20 % ihrer hydrodynamischen Größe (VON DER MARK und GLÜCKERT 1990). Dies beruht darauf, dass das kollagene Netzwerk dem Quelldruck der Proteoglykane einen Widerstand entgegensetzt, wodurch es unter einer permanenten Vorspannung steht (MARUODAS 1979; MAROUDAS und BANNON 1981; MYERS und MOW 1983). Die Proteoglykane sorgen also für den hohen Wassergehalt der Knorpelmatrix (HARDINGHAM TE und FOSANG 1992) und spielen außerdem eine wichtige Rolle in der Organisation des molekularen Aufbaus der EZM (GALLAGHER 1989).

Die Proteoglykane des hyalinen Knorpels kann man in zwei große Gruppen einteilen, nämlich zum einen die großen, Aggregate-bildenden Proteoglykanmonomere wie Aggrecan und zum anderen die kleineren Proteoglykane, zu denen auch Dekorin, Biglykan oder Fibromodulin gehören (HARDINGHAM TE et al. 1992; POOLE AR et al. 1996; ROSENBERG 1992; ROSENBERG und BUCKWALTER 1986; ROUGHLEY und LEE 1994; SANDELL et al. 1995). Diese kleineren, nicht-aggregierenden Proteoglykane binden an verschiedene Makromoleküle in der EZM (BUCKWALTER und MANKIN 1998a) und wirken inhibierend auf die Bildung von Kollagenfasern sowie die Fibronectinbindung (ROSENBERG 1992). Des Weiteren haben sie Einfluss auf das Verhalten der Chondrozyten (BUCKWALTER und MANKIN 1998a), indem sie über TGF- β die Matrixsynthese und Mitoseaktivität der Chondrozyten steuern (ROSENBERG 1992).

Aggrecan gehört zur Familie der Hyaluron-bindenden Proteine (HARDINGHAM TE und FOSANG 1992) und ist das häufigste Proteoglykan im hyalinen Knorpel (HARDINGHAM T 1981; SANTER et al. 1982). Außerdem gilt es als spezifisch für Knorpelgewebe (HARDINGHAM TE und FOSANG 1992). Aggrecan besteht aus einem *core protein*, an das radial einige hundert Chondroitin-Sulfat-Ketten und etwa 30 Keratin-Sulfat-Ketten

angelagert sind (MUIR 1995). Eine besondere Eigenschaft von Aggrecan ist, dass sich mehrere Aggrecanmoleküle mit Hyaluronsäure zu großen Aggrecan-Hyaluron-Komplexen verbinden können, wobei die nicht kovalente Bindung durch Link-Protein, das ein kleines Glykoprotein darstellt, stabilisiert wird (HARDINGHAM TE und MUIR 1972; HARDINGHAM TE et al. 1983; MUIR 1979; HASCALL und SAJDERA 1969; HASCALL und HEINEGARD 1974; HASCALL 1977; MUIR 1995).

Aufgrund ihrer Größe sind diese Komplexe fest in dem Kollagennetzwerk verankert und bleiben auch ortständig, wenn das durch sie gebundene Wasser unter Belastung in weniger belastete Regionen strömt (MUIR 1995). Trotz der vollständig reversiblen Umverteilung des Wassers unter Belastung, wird die Hydratation der Proteoglykane stets aufrechterhalten (HASCALL 1977; KEMPSON 1979; MAROUDAS et al. 1983). Diese Aggregatebildenden Proteoglykane lassen sich wiederum in zwei Gruppen unterscheiden, nämlich in eine Gruppe von kleineren, langsam sedimentierenden Proteoglykanen und in eine Gruppe größerer und schneller sedimentierender Proteoglykane (BUCKWALTER et al. 1994b; MÜLLER et al. 1989; PITA et al. 1990; PITA et al. 1992). Eine der ersten Veränderungen bei Osteoarthrose und Immobilisation eines Gelenkes ist der Verlust von diesen großen Aggregatebildenden Proteoglykanen (BUCKWALTER und MANKIN 1998a), der auch im Alter auftritt (BUCKWALTER et al. 1985, 1994a).

1.1.1.c Glykoproteine und nicht-kollagene Proteine

Die vielfältigen Gruppen der nicht-kollagenen Proteine und der Glykoproteine sind nicht so umfassend untersucht und verstanden wie die Kollagene oder die Proteoglykane (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Grundsätzlich bestehen diese Moleküle aus einem Protein, an das einige wenige Mono- oder Oligosaccharide gebunden sind (HEINEGÅRD und PIMENTEL 1992; HEINEGÅRD et al. 1995). Einige dieser Moleküle sind bekannt dafür, dass sie bei der Strukturierung und Aufrechterhaltung der EZM mithelfen und

Interaktionen zwischen den Chondrozyten und der Knorpelmatrix vermitteln (BUCKWALTER und MANKIN 1998a).

1.1.2 Histologischer Aufbau von hyalinem Knorpel

Der hyaline Knorpel lässt sich in vier Zonen, nämlich die oberflächliche, die mittlere und die tiefe Zone sowie die Zone des kalzifizierten Knorpels einteilen (POOLE CA 1997).

Die oberflächliche Zone enthält flache scheibenförmige Chondrozyten, die wenig Proteoglykane, aber eine große Menge von einheitlichen Kollagenfasern synthetisieren, die eine dicht gepackte, tangential verlaufende Schicht bilden (BUCKWALTER und MANKIN 1998a; POOLE CA 1997). Durch diese Fibrillen und ihre Anordnung erhält die oberflächliche Zone eine größere Steifheit und Zugfestigkeit als die tiefer gelegenen Zonen und kann so den Scherkräften, die während der Gelenkbewegungen auf sie einwirken, widerstehen (BUCKWALTER et al. 1988; MOW und ROSENWASSER 1988; ROTH und MOW 1980). Das Volumen der mittleren Zone ist gewöhnlich um ein Vielfaches größer als das der oberflächlichen Zone (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Die Chondrozyten haben hier ein rundliches bis sphärisches Aussehen (POOLE CA 1997). Außerdem steigt in dieser Zone der Proteoglykangehalt gegenüber der oberflächlichen Zone an, wobei die Konzentrationen von Kollagenen und Wasser im Vergleich sinken (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Die Ausrichtung der Kollagenfasern in der mittleren Zone ist gekreuzt, um so ein schräg verlaufendes Netzwerk zu formen und eine Verbindung zwischen den Kollagenfasern der oberen und der tiefen Zonen zu schaffen (POOLE CA 1997). Die tiefe Zone besteht aus runden Chondrozyten, die in Säulen senkrecht zur Knorpeloberfläche angeordnet sind (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Sie enthält die höchste Konzentration von Proteoglykanen und weist den geringsten Wassergehalt auf (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Die Kollagenfibrillen der tiefen Zone haben den größten Durchmesser (BUCKWALTER und MANKIN 1998a) und bilden ein radial

verlaufendes Netzwerk (POOLE CA 1997). Die Tidemark, eine dünne wellenförmige Linie, markiert den Übergang von der tiefen Zone zur kalzifizierten Zone (POOLE CA 1997) und trennt den nicht kalzifizierten vom kalzifizierten Knorpel. In der Zone des kalzifizierten Knorpels finden sich ebenfalls runde Chondrozyten, die in nicht kalzifizierten Lakunen liegen (POOLE CA 1997). Diese Zone enthält keine Proteoglykane, und die radialen Kollagenfibrillen sind in einer kalzifizierten Matrix verankert (POOLE CA 1997). Die Zone des kalzifizierten Knorpels bildet so mit dem subchondralen Knochen einen verzahnten Übergang, wodurch eine feste Verbindung von Knorpel und Knochen gewährleistet wird (POOLE CA 1997). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit zunehmender Entfernung von der Knorpeloberfläche die Zelldichte abnimmt, wohingegen die Zellgröße und der Gehalt an Proteoglykanen im Verhältnis zu den Kollagenen ansteigen (GOLDRING MB und MARCU 2009).

Neben dieser Einteilung des Knorpels nach den strukturellen Unterschieden lässt sich der hyaline Knorpel auch aus zellulärer Sicht einteilen (POOLE CA 1997). So umgeben jeden einzelnen Chondrozyten verschiedene Zonen (POOLE CA 1997). Direkt um die Chondrozyten befindet sich die perizelluläre Matrix (PM), um diese herum liegt die etwas weiter gefasste territoriale Matrix (TM), die wiederum von der die einzelnen Territorien einbettenden interterritorialen Matrix (IM) umgeben wird (POOLE CA 1997). Diese Einteilung des Knorpels führt zu dem Konzept des Chondrons als anatomische und funktionelle Untereinheit des hyalinen Knorpels, das erstmals durch BENNINGHOFF (1925) geprägt wurde und später durch POOLE CA et al. (1988b) bestätigt werden konnte. Ein Chondron besteht aus einem einzelnen Chondrozyten, dessen Zelloberfläche mit einer perizellulären Glykokalix verbunden ist, die von einer perizellulären Kapsel umhüllt wird (POOLE CA 1997). Chondrone weisen eine Polarität auf, d. h. der der Gelenkfläche zugewandte Teil besitzt eine dichtere Konsistenz, wohingegen der dem Knochen zugewandte Pol aus einem lockeren, sich zur Tidemark hin verjüngenden Schweif besteht (POOLE CA 1997). Chondrone

können auch in so genannten Chondronenhaufen vorkommen, wobei die schweiförmigen Ausläufer als Verbindungsstücke zwischen den einzelnen Chondronen dienen (POOLE CA 1997).

Die einzelnen Zonen, die ein Chondron umgeben, lassen sich anhand von unterschiedlichem Vorkommen und Gehalt verschiedener Bestandteile der EZM unterscheiden (POOLE CA 1997). Die PM ist reich an Aggrecan (POOLE CA et al. 1991) und anderen sulfurierten Proteoglykanen (POOLE CA 1992). Außerdem ist das zu den Glykoproteinen gehörende Link-Protein vornehmlich in der PM nachzuweisen (RATCLIFFE und MOW 1996). Dünne Kollagenfasern bilden in der PM ein enges und kompaktes Netz um die Chondrozyten (POOLE CA et al. 1984, 1987), das den Zellen einen gewissen mechanischen Schutz während der Verformung des Gewebes unter Belastung bietet (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Obwohl Kollagen Typ VI nur einen geringen Teil der Gesamtmasse an Kollagenen im hyalinen Knorpel ausmacht (EYRE et al. 1992) und kaum in der TM und IM zu finden ist, kommt es in der PM in hohen Konzentrationen vor und weist dort direkte Interaktionen mit der Zelloberfläche auf (POOLE CA et al. 1988a, 1992). Aufgrund dieser Eigenschaften ist Kollagen VI ein wichtiger molekularer Marker für das Vorhandensein und den Aufbau von Chondronen (POOLE CA 1997). Kollagen IX lässt sich vornehmlich in der PM nachweisen (WOTTON et al. 1991).

Die TM enthält nur geringe Mengen von Kollagen IX (POOLE CA et al. 1997). Folglich weisen die Kollagenfasern hier einen größeren Durchmesser auf und formen außerdem radial verlaufende Stränge (POOLE CA et al. 1984, 1987).

Auf die IM entfällt der größte Teil des Knorpelvolumens im Erwachsenenalter (BUCKWALTER und MANKIN 1998a). Da Kollagen IX in der IM nicht vorkommt, enthält sie die größten Kollagenfasern, die kompakt und radial angeordnet sind (POOLE CA 1997).

1.1.3 Funktion des Knorpels

Der hyaline Gelenkknorpel muss in der Lage sein, die auf das Gelenk einwirkenden Druck- und Scherkräfte zu absorbieren, umzuverteilen und an den unter dem Knorpel liegenden Knochen weiterzugeben (POOLE CA 1997). Um diesen vielfältigen Anforderungen gerecht werden zu können, wirken die Chondrozyten und die EZM zusammen (POOLE CA 1997).

Die Pufferfunktionen des Gelenkknorpels beruhen auf der hohen Wasserbindungsfähigkeit, der damit verbundenen Quelltendenz und der geringen Wasserdurchlässigkeit der Hyaluron-Aggregan-Komplexe sowie dem festen Einbau dieser Proteoglykane in das Netzwerk aus Kollagenfasern (POOLE CA 1997). Der Knorpel kann sich unter Druck reversibel elastisch verformen, indem Wasser in weniger belastete Regionen strömt (RATCLIFFE und MOW 1996). Bei Entlastung nehmen die im Kollagen-netzwerk verankerten Hyaluron-Aggregan-Komplexe erneut Wasser auf und schaffen so ein neues Gleichgewicht zwischen Last und ihrer Quelltendenz (RATCLIFFE und MOW 1996).

Diese physiologischen Prinzipien gelten nicht nur für die Knorpelmatrix als Gesamtheit, sondern können auch auf das Chondron als mechanische Untereinheit übertragen werden (POOLE CA 1997). So konnte festgestellt werden, dass sich Chondrone unter Belastung in vertikaler Richtung verdichten und sich in seitlicher Richtung verformen, aber bei Entlastung wieder in ihre Ausgangsform zurückkehren (BROOM und MYERS 1980; POOLE CA et al. 1984).

1.2 Erkrankung des Knorpels - Osteoarthritis

Die Osteoarthritis zählt zu der Gruppe der Erkrankungen des muskulo-skeletalen Systems (WOOLF und PFLEGER 2003). Hierbei handelt es sich um eine pathophysiologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, denen jedoch die anatomische Lokalisation, die Assoziation mit starken Schmerzen sowie die Einschränkung der Funktion der betroffenen Gelenke gemeinsam

sind (WOOLF und PFLEGER 2003). Die muskuloskeletalen Erkrankungen sind der häufigste Grund für Invalidität im höheren Lebensalter und führen öfter als jede andere Gruppe von Erkrankungen zu eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit unter der erwachsenen Bevölkerung in den westlich geprägten Industrienationen (WOOLF und PFLEGER 2003). Die WHO geht davon aus, dass durch die steigende Lebenserwartung und den demografischen Wandel die Osteoarthritis bis zum Jahr 2020 den vierthäufigsten Grund für Invalidität darstellen wird (WOOLF und PFLEGER 2003). Im Lichte dieser Entwicklungen werden die durch die Osteoarthritis verursachten Kosten immer mehr an Bedeutung gewinnen und zu einer Herausforderung für die Gesundheitssysteme und betroffenen Gesellschaften werden (REGINSTER 2002).

Bei der Osteoarthritis handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung, die durch einen fortschreitenden Abbau des Gelenkknorpels gekennzeichnet ist und zu einem progredienten Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes führt (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007; WOOLF und PFLEGER 2003). Dennoch ist die Osteoarthritis keine rein auf den hyalinen Knorpel beschränkte Erkrankung (BRANDT et al. 2006), sondern betrifft mehrere Bestandteile des Gelenkes, da sie sowohl mit einer umschriebenen intraartikulären Entzündung mit Synovitis als auch mit strukturellen Veränderungen im subchondralen und periartikulären Knochen einhergeht (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). So kommt es zu einer Verbreiterung und Verdichtung (Sklerosierung) des subchondralen Knochens, dem Auftreten von zystischen Veränderungen in diesem Bereich und zu der Entstehung von knöchernen Anbauten der Gelenkfläche, den Osteophyten (BUCKWALTER und MANKIN 1998b; HILL et al. 2001; BUCKLAND-WRIGHT 2004; BURR 2004). Die am häufigsten von Osteoarthritis betroffenen Regionen sind die Hüft- und Kniegelenke sowie die Hände und die Wirbelsäule (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Die klinische Symptomatik ist variabel, wird jedoch von Schmerzen und einem progredienten Funktionsverlust in den betroffenen Gelenken bestimmt,

wobei häufig auch Entzündungszeichen wie Gelenkschwellungen und Steifigkeit auftreten können (FELSON 2006). Die Schmerzen stellen das auffälligste Symptom der Osteoarthrose dar (KAZIS et al. 1983) und sind hauptverantwortlich für die zunehmende Einschränkung der Mobilität der Patienten (VAN BAAR et al. 1998).

1.2.1 Pathogenese der Osteoarthrose

Die Osteoarthrose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung und die Faktoren, die die Entstehung und das Voranschreiten der Krankheit begünstigen, lassen sich verschiedenen Kategorien, nämlich den genetischen, den biomechanischen und den altersbedingten Faktoren, zuordnen (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007).

Obwohl das zunehmende Alter als größter Risikofaktor für das Auftreten von Osteoarthrose gilt (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007) und die altersbedingten strukturellen Veränderungen des Knorpels und seiner Matrix unausweichlich sind, ist die Entwicklung einer Osteoarthrose zwar häufig, aber nicht zwangsläufig (CARRINGTON 2005). Zu den altersbedingten Veränderungen gehören die Aufweichung der Knorpeloberfläche sowie der Verlust von Scherfestigkeit und Steifheit der Knorpelmatrix (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Diese geminderten Gewebeeigenschaften sind auf einen veränderten strukturellen Aufbau der EZM im Alter zurückzuführen (DUDHIA 2005; LOESER 2006; AIGNER et al. 2007), der daher rührt, dass Hauptbestandteile der EZM - wie die Proteoglykane und das Kollagen Typ II - während des Alterungsprozesses einen Wandel in ihrer Zusammensetzung und ihrem Aufbau erfahren, aber auch schlicht in veränderten Konzentrationen vorliegen (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). So nehmen beispielsweise sowohl die Größe als auch der Gehalt der Aggrecanmoleküle innerhalb der Knorpelmatrix deutlich ab, wodurch die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels gemindert werden (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Zudem nimmt mit steigendem Alter die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten ab, so dass sie die EZM

nicht mehr so effektiv erneuern und reparieren können (DUDHIA 2005; AIGNER et al. 2007). Des Weiteren treten mit zunehmendem Alter vermehrt Fibrillationen der Knorpeloberfläche auf (KOEPP et al. 1999; BUCKWALTER et al. 2000), wobei zu beachten bleibt, dass die meisten Patienten mit diesen Fibrillationen keine Schmerzen oder Bewegungseinschränkungen zeigen und dieser Befund nicht zwangsläufig in die Entwicklung einer Osteoarthrose mündet (MARTIN und BUCKWALTER 2002).

Der Gelenkknorpel ist für die Lastverteilung über dem Gelenk verantwortlich und daher können eine übermäßige Belastung des Gelenkes oder eine Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des Knorpels zur Entstehung oder Progression einer Osteoarthrose führen (ROOS 2005). Die Chondrozyten besitzen Rezeptoren, die auf mechanische Belastungen ansprechen (MILLWARD-SADLER und SALTER 2004), wodurch die Chondrozyten in der Lage sind, durch Anpassung ihrer Stoffwechselaktivität direkt auf biomechanische Einflüsse zu reagieren (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Hierbei zeigten In-vitro-Experimente, dass eine übermäßige statische Belastung den Abbau von Proteoglykanen fördert, das kollagene Netzwerk beschädigt und zu einer verminderten Synthese von Matrixproteinen führt, wohingegen eine dynamische Kompression des Knorpels eine Steigerung der Syntheseaktivität der Chondrozyten bedingt (GUILAK et al. 2004). Einige dieser Rezeptoren werden auch durch Bestandteile der EZM stimuliert (MILLWARD-SADLER und SALTER 2004). Zu diesen Rezeptoren gehören verschiedene Integrine, die durch Fibronectin und Kollagen II-Fragmente aktiviert werden und daraufhin die Bildung von Matrix-abbauenden Enzymen und Zytokinen steigern (PULAI et al. 2005). Sowohl eine übermäßige mechanische Belastung als auch Fragmente der EZM lösen hierbei die gleichen Signalkaskaden aus wie die Zytokine, die durch die begleitende Entzündungsreaktion entstehen (FITZGERALD et al. 2004; FANNING 2003; DESCHNER et al. 2003; ZHOU Y et al. 2007; KNOBLOCH et al. 2008).

Auf diese Weise begünstigt die begleitend auftretende Synovitis den Progress der Osteoarthrose, indem sie ebenfalls zu einem Ungleichgewicht zwischen den anabolen und den katabolen Prozessen der Matrixerneuerung durch die Chondrozyten führt (LOESER 2006). Die Chondrozyten in osteoarthrotischem Knorpel exprimieren vermehrt unterschiedliche Chemokine und Chemokinrezeptoren, die an der Entstehung des Knorpelkatabolismus mitwirken (BORZI et al. 2004). So finden sich in osteoarthrotischem Knorpel erhöhte Syntheseaktivitäten für die Matrixmetalloproteinasen 1, 3, 8 und 13 (MMP), sowie für die Aggrecanasen - hier besonders ADAMTS 5 - (CAWSTON und WILSON 2006; PLAAS et al. 2007). Den MMP und den Aggrecanasen wird in der Osteoarthrose eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie Kollagene und Proteoglykane zersetzen, wobei MMP 1, MMP 8 und MMP 13 für den enzymatischen Abbau der Kollagene verantwortlich sind (CAWSTON und WILSON 2006; SANDY 2006; RENGEL et al. 2007; MURPHY und NAGASE 2008) und ADAMTS 4 und 5 als die bedeutendsten Aggrecan-abbauende Enzyme gelten (ARNER 2002; PLAAS et al. 2007).

Die gestörte Interaktion zwischen den Chondrozyten und der EZM stellt den wichtigsten Faktor in der Pathogenese der Osteoarthrose dar (POOLE AR 1999; TESCHE und MIOSGE 2005), womit den Chondrozyten eine Schlüsselrolle zukommt, da sie als Reaktion auf schädliche Einflüsse den Abbau der Knorpelmatrix befördern und wichtige Prozesse der Knorpelregeneration herabregulieren (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Im Verlauf der Osteoarthrose ändern die Chondrozyten ihr Verhalten, was in dem Vorkommen von Fibrillationen, dem Abbau der Knorpelmatrix, dem Auftreten von Zellclustern und den Veränderungen in Menge, Verteilung und Zusammensetzung von Proteinen der EZM zum Ausdruck kommt (PRITZKER et al. 2006) und zum Teil einem Regenerationsversuch geschuldet ist. Hinzu kommt das Auftreten eines weiteren Chondrozytentyps (CALANDRUCCIO und GILMERS 1962; MIOSGE et al. 1998; POOLE AR 1999), so dass in den späten Stadien der Osteoarthrose drei Arten von

Chondrozyten im Knorpelgewebe zu finden sind (TESCHE und MIOSGE 2005). Zum einen gibt es gesunde Chondrozyten, die zunehmend degenerieren und bereits degenerierte Zellen, welche stetig abgebaut werden, zum anderen kommen fibroblastenartige Chondrozyten vor, die nicht von dem Krankheitsprozess betroffen zu sein scheinen (TESCHE und MIOSGE 2005). Diese fibroblastenartigen Chondrozyten sind vornehmlich in den tieferen Zonen des osteoarthrotischen Knorpels zu finden (TESCHE und MIOSGE 2005), während die noch vorhandenen gesunden Chondrozyten häufig in Zellclustern angeordnet sind (KOURI et al. 1996; MIOSGE et al. 1998; BOCK et al. 2001).

1.2.2 Verlauf der Osteoarthrose

Der morphologische Ablauf der Osteoarthrose besteht aus einer primären Erweichung des Knorpelgewebes und einer nachfolgenden Verringerung der Knorpeldicke (SULZBACHER 2000).

Aus histologischer Sicht zeigt die Osteoarthrose einen stadienhaften Verlauf, der sich in ein initiales, reversibles Stadium, ein Stadium mit sichtbaren Veränderungen, ein Stadium mit fortgeschrittenen Veränderungen und ein Endstadium mit vollständigem Knorpelverlust aufteilt (SULZBACHER 2000).

Eine der ersten Veränderungen in der Frühphase der Osteoarthrose ist die Schädigung der Zusammensetzung und Struktur der EZM (BUCKWALTER und MANKIN 1998b). Die Schädigung der EZM selbst setzt Stoffe frei, die die Chondrozyten anregen (HARDINGHAM T 1993, MARTIN und BUCKWALTER 2002), so dass ein Regenerationsversuch beginnt, indem die Chondrozyten die Synthese von Komponenten der EZM wie den Kollagenen Typ II, Typ VI, Typ IX, Typ XI und Aggrecan steigern (POOLE AR et al. 2007; SULZBACHER 2000). Außerdem bilden sie Zellcluster mit gesteigerter Proliferation, wofür sie ihren postmitotischen Zustand verlassen (HORTON et al. 2005). Hierdurch kann in dieser Phase der Knorpel vorübergehend erhalten und teilweise sogar erneuert werden (SULZBACHER 2000; MARTIN und BUCKWALTER 2002). Nach einiger Zeit unterliegt dieser

Reparaturversuch durch die gesteigerte Syntheseaktivität der Chondrozyten dem ebenfalls gesteigerten Abbau der Knorpelmatrix und es bildet sich ein Ungleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau der EZM durch die Chondrozyten aus (SULZBACHER 2000; SANDELL und AIGNER 2001; MARTIN und BUCKWALTER 2002).

So kommt es im frühen symptomatischen Stadium zu oberflächlichen Aufrauungen und Rissen sowie zu einer Schwellung und Aufweichung des Knorpelgewebes (SULZBACHER 2000; GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Diese Fibrillationen sind durch einen vermehrten Abbau von Kollagen Typ II und Kollagenfibrillen in der oberflächlichen Zone bedingt (HOLLANDER et al. 1994, 1995). Außerdem nimmt auch die Expression des Kollagen II-Gens in der oberflächlichen Zone mit wachsendem Matrixuntergang ab (AIGNER et al. 2006). In den tieferen Knorpelschichten erfolgt im Gegenzug ein kompensatorischer Anstieg der Kollagen Typ II-Synthese (POOLE AR et al. 2007), der auch in den späten Stadien der Osteoarthritis anhält (AIGNER et al. 2006). Auch die initiale Schwellung und Aufweichung des Knorpels entstehen aus der Zerstörung des Kollagennetzwerkes durch die Kollagenasen und der damit verbundenen Separation der Kollagenfasern, da dem Quelldruck der Proteoglykane hierdurch weniger Widerstand entgegengesetzt wird und diese vermehrt Wasser binden können (SULZBACHER 2000; VENN und MAROUDAS 1977; STOCKWELL et al. 1983). Gleichsam kommt es durch die vermehrte Synthese von proteolytischen Enzymen auch zu einem Verlust von Proteoglykanen in der EZM (SULZBACHER 2000; GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Diese fortschreitende Abnahme von Proteoglykanen führt dann schließlich zu einer Abnahme des Wassergehaltes und somit zu einer Minderung der biomechanischen Eigenschaften - wie Elastizität und Spannkraft - des Knorpels (SULZBACHER 2000). Der im weiteren Verlauf der Osteoarthritis ausgeprägte Abbau und Verlust an Knorpelmatrix, wobei sich tiefe vertikale Risse bis in die Zone des mineralisierten Knorpels bilden, ist kennzeichnend für die fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (SULZBACHER 2000).

Auch in diesen späten Stadien der Osteoarthrose sind die fibroblastenartigen Chondrozyten noch Teil des ablaufenden Regenerationsversuches des Gewebes, insofern sie ein fibrocartilaginäres Narbengewebe synthetisieren, das im Gegensatz zum normalen hyalinen Knorpel nicht aus Kollagen Typ II, sondern hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht (TESCHE und MIOSGE 2005). Die vermehrte Produktion von Kollagen Typ I stellt einen wichtigen Faktor für die Progression der Erkrankung dar, da es die physiologischen Aufgaben des Kollagen Typ II nicht übernehmen kann (GAY et al. 1976; MIOSGE et al. 2004). Somit sind die Chondrozyten nicht in der Lage, die in der Entwicklung angelegte komplexe Struktur des kollagenen Netzwerkes wiederherzustellen, nachdem eine schwerwiegende Schädigung der Knorpelmatrix eingetreten ist (GOLDRING MB und GOLDRING SR 2007). Die gebildete Ersatzmatrix kann den Verlust von Kollagen Typ II und Aggrecan nicht kompensieren, da sie aufgrund der veränderten Zusammensetzung im Vergleich zum gesunden hyalinen Knorpel verminderte Gewebeeigenschaften aufweist (TESCHE und MIOSGE 2005). Im weiteren Verlauf der Osteoarthrose kommt es in der Übergangszone zwischen hyalinem Knorpel und dem subchondralen Knochen zu Gefäßeinsprossungen und zu einer Ausbreitung von Gefäßneubildungen im Bereich der Tidemark, die zu einer weiteren Abnahme der Knorpeldicke beitragen (LANE et al. 1977; BURR und SCHAFFLER 1997). Das Endstadium ist von einem vollständigen Verlust des Gelenkknorpels gekennzeichnet und führt zu der Freilegung des subchondralen Knochens, der reaktiv deutlich verbreitert ist (SULZBACHER 2000).

1.2.3 Therapiekonzepte

Für die Therapie der Osteoarthrose werden sowohl konservative als auch operative Behandlungsstrategien eingesetzt. Hierbei wird unter der Regeneration eine genaue Wiederherstellung der originalen Struktur des Gelenkknorpels verstanden, wohingegen die Reparatur eine andersartige

und potentiell minderwertige Form der Knorpelheilung darstellt (NOYES und STABLER 1989; MADRY 2005; MADRY et al. 2010).

1.2.3.a Konservative Therapiekonzepte

Zu den konservativen Behandlungsansätzen zählen physikalische Maßnahmen, die zeitweilige Entlastung des betroffenen Gelenkes und die medikamentöse Therapie, zu der auch die intraartikulären Injektionen gehören (STEINMEYER und KONTTINEN 2006; ZHANG et al. 2010; BELLAMY et al. 2006). Die medikamentöse Therapie hat den Erhalt der Funktionsfähigkeit des Gelenkes und das Hinausschieben des Einsatzes operativer Maßnahmen zum Ziel (MADRY et al. 2011), wobei die Schmerzreduktion in der Behandlung symptomatischer Knorpelschäden die oberste Priorität aufweist (STEINMEYER und KONTTINEN 2006; ALTMAN 2010). So kann durch den Einsatz der pharmakologischen Arthrotherapie die Gelenkfunktion unter Schmerzkontrolle stadienabhängig und zumindest temporär aufrechterhalten werden (MADRY et al. 2011). Die vorhandenen kausalen pharmakologischen Strategien für die Therapie der Arthrose sollen den Prozess der Knorpeldegeneration verlangsamen (STEINMEYER und KONTTINEN 2006). Hiefür werden Medikamente aus der Gruppe der *slow acting drugs in osteoarthritis* (SADOA) eingesetzt (MADRY et al. 2011). Diese Gruppe lässt sich wiederum in die *symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis* (SYSADOA), die die Gelenkfunktion verbessern und zu einer Schmerzreduktion führen, und in die *disease modifying osteoarthritis drugs* (DMOAD) aufteilen, die die Knorpeldegeneration aufhalten sollen (MADRY et al. 2011).

1.2.3.b Operative Therapiekonzepte

Die rekonstruktiv-operativen Therapieverfahren kommen bei Schädigungen des Gelenkknorpels zum Einsatz, die trotz konservativer Therapie weiterhin symptomatisch bleiben (MADRY et al. 2011). Mit den rekonstruktiv-chirurgischen Methoden sollen eine Verbesserung der Funktion oder der

Kongruenz des betroffenen Gelenkes bewirkt werden, um eine arthrotische Schädigung noch intakter Knorpelareale zu verhindern (MADRY et al. 2011). Hierfür werden entweder die Bildung eines Reparaturgewebes initiiert oder eine Entlastung geschädigter Gelenkanteile herbeigeführt (MADRY et al. 2011). Zu den operativen Behandlungsformen zählen das Débridement, die autologen osteochondralen Transplantate, die Umstellungsosteotomien, sowie zellbiologische Ansätze, wie z.B. die markeröffnenden Verfahren, die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) und die Transplantation von adulten mesenchymalen Stammzellen (MSC) (MADRY et al. 2011). Durch ein Débridement werden ausgefaserte Knorpelfragmente abgetragen und so Gelenkblockaden oder die Übertragung von Scherkräften auf unversehrte Knorpelbereiche verhindert (MADRY et al. 2011). Allerdings kann das Voranschreiten der Osteoarthrose durch ein alleiniges Débridement nicht aufgehalten werden (MADRY et al. 2011). Die markraumeröffnenden Verfahren eignen sich besonders für die Versorgung von kleinen umschriebenen Knorpeldefekten (MITHOEFER et al. 2009). Hierfür wird der subchondrale Knochenmarksraum durch Mikrofrakturierung, Pridie-Bohrung oder Abrasionsarthroplastik eröffnet (STEADMAN et al. 2001; PRIDIE 1959; JOHNSON 1986), woraufhin sich ein Blutgerinnsel bildet, das die Grundlage für die Bildung eines Reparaturgewebes aus Faserknorpel bildet (MADRY et al. 2011). Außerdem wird vermutet, dass durch die Eröffnung des Markraumes MSC aus dem Knochenmark in den Knorpel einwandern und dort für die Entstehung dieses Ersatzgewebe sorgen (PRIDIE 1955; SIMON und JACKSON 2006; SANDELL und AIGNER 2001; TESCHE und MIOGGE 2005). Für die ATC werden Chondrozyten durch eine Knorpelbiopsie aus dem betroffenen Gelenk gewonnen und in einer Zellkultur vermehrt, um dann schließlich in den Knorpeldefekt eingebracht zu werden (BRITTBURG et al. 2003). Die ACT wird hauptsächlich für die Behandlung von großen, alle Knorpelschichten betreffenden Defekten eingesetzt (BEHRENS et al. 2004; GOMOLL 2010; HARRIS et al. 2010; NIEMEYER et al. 2010; MOSELEY et al. 2010). Außerdem ist die ACT für die Therapie von Defekten indiziert, bei

denen andere Verfahren keinen Erfolg gezeigt haben (MADRY 2005; MINAS et al. 2009; BRITTBERG 2010; MADRY und PAPE 2008).

Die angeführten rekonstruktiv-chirurgischen Verfahren haben für die Therapie von arthrotischen Knorpelschäden eine untergeordnete Bedeutung, denn in diesem Fall stehen die endoprothetische Versorgung und die Umstellungsosteotomien im Vordergrund (MADRY et al. 2011). Die Umstellungsosteotomien können die Zeitspanne bis zur Implantation einer Endoprothese verlängern, indem geschädigte Knorpelanteile entlastet werden und so die Ausbreitung der Knorpeldegeneration verlangsamt wird (MADRY et al. 2011). Bei Vorliegen eines vollständigen Verlusts des Gelenkknorpels stellt der endoprothetische Oberflächenersatz meist die einzige Therapieoption dar (LÜTZNER et al. 2009). Die bisher erwähnten Therapieverfahren können eine Progression der Osteoarthrose nicht verhindern und führen bestenfalls zu einem fibrocartilaginären Reparaturgewebe, das deutlich geminderte biomechanische Eigenschaften im Vergleich zu gesundem hyalinen Knorpel aufweist. Dies bedeutet, dass sie für die meisten Patienten eine nur zeitweilige Verbesserung der Symptomatik erreichen und diese im Verlauf auf die Implantation eines endoprothetischen Gelenkersatzes angewiesen sind (LOHMANDER und ROOS 2007).

1.2.3.c Zellbiologische Therapiekonzepte

Die zellbiologischen Konzepte haben die Regeneration des Gewebes auf zellulärer Ebene zum Ziel und verwenden hierfür vornehmlich Stammzellen oder den Stammzellen ähnliche Zellen.

Die eigentlichen Stammzellen sind während der embryonalen Entwicklung im Stadium der Blastozyste in der inneren Zellmasse zu finden (KOELLING und MIOSGE 2009) und in der Lage sich in Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln. Diese embryonalen Stammzellen konnten isoliert und *in vitro* differenziert werden (THOMPSON et al. 1998) und stellen einen viel versprechenden Ausgangspunkt für regenerative Therapien dar (KOELLING und MIOSGE 2009). Ein möglicher Einsatz der embryonalen Stammzellen

bringt allerdings verschiedene Schwierigkeiten mit sich, da die Gewinnung dieser Zellen sowohl mit ethischen als auch rechtlichen Problemen verbunden ist. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die embryonalen Stammzellen die Neigung besitzen Teratome auszubilden, weshalb nach einer Behandlung mit diesen Zellen eine vermehrte Entwicklung von Tumoren festgestellt werden konnte (BLUM und BENVENISTY 2007). Im Laufe der Embryonalentwicklung formen die embryonalen Stammzellen die drei Keimblätter, nämlich das Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm, das sich in der ersten ektodermalen-mesenchymalen Transdifferenzierung aus dem Ektoderm entwickelt (KOELLING und MIOSGE 2009). Aus dem Mesoderm entstehen dann die mesenchymalen Zellen, die Bestandteile der verschiedenen Bindegewebe, wie Knochen, Sehnen, Muskeln und Knorpel, sind (KOELLING und MIOSGE 2009).

Es wird angenommen, dass sich einige dieser embryonalen mesenchymalen Zellen nicht weiter differenzieren und in jedem dieser Gewebe vorhanden sind (KRUEGEL et al. 2008). Zusammenfassend werden diese Zellen als adulte mesenchymale Stammzellen bezeichnet und sie sollen die Fähigkeit besitzen geschädigtes Gewebe regenerieren zu können (KRUEGEL et al. 2008). Es wird vermutet, dass die MSC relativ untätige Zellen sind, die in einer geschützten Nische, welche von somatischen Zellen gebildet wird, im Gewebe verharren und sich nur selten teilen (FUCHS et al. 2004; FUCHS 2008), wobei die Zellteilung sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch erfolgen kann (KOELLING und MIOSGE 2009). MSC-Populationen konnten bisher in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (KRUEGEL et al. 2008), zu denen auch das Knochenmark, das Fettgewebe oder die Synovia gehören (KASSEM und ABDALLAH 2008). Diese MSC könnten auch als mesenchymale Progenitorzellen bezeichnet werden, da die beschriebenen Zellen ihre angestammte Stammzellnische verlassen haben und damit dem transienten Pool sich vermehrender Zellen angehören (KRUEGEL et al. 2008). Diverse aus dem Knochenmarkstroma stammende MSC-Populationen konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in knorpelartiges

Gewebe differenziert werden (JOHNSTONE et al. 1998; MACKAY et al. 1998; SEKIYA et al. 2001; GRONTHOS et al. 2003; DE BARI et al. 2004; JONES et al. 2004; ENGLISH et al. 2007; KHAN et al. 2007; TUAN et al. 2003). Daher gibt es schon seit längerem die Vorstellung, dass MSC oder Zellen, die auf dem Weg von dem Stadium einer Stammzelle zu einer ausdifferenzierten Zelle sind, für eine regenerative Behandlung der Osteoarthrose eingesetzt werden könnten. So injizierten AGUNG et al. (2006) MSC in arthrotische Gelenke und beobachteten, dass die MSC knorpelartige EZM im Gewebe synthetisierten. Auch waren MSC nach intraartikulärer Injektion in der Lage die Progression der OA zu vermindern (MOKBEL et al. 2011; AGUNG et al. 2006).

KOELLING et al. (2009) konnten nachweisen, dass das Reparaturgewebe aus menschlichem Gelenkknorpel während der späten Stadien der Osteoarthrose eine vorher unbekannte Population von Zellen mit Stammzellcharakteristika beherbergt, die chondrogene Progenitorzellen (CPC) benannt wurden. Diese Zellen könnten nun auch einen möglichen Ausgangspunkt für eine regenerative Therapie der Osteoarthrose darstellen, da sie die Fähigkeiten zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien, besonders in die chondrogene Richtung, zur klonalen Proliferation und zur Migration aufweisen (KOELLING et al. 2009).

1.3 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Fähigkeit der CPC zur Migration, ihre Proliferationsfähigkeit *ex vivo* und die Auswirkungen der Kultivierung *in vitro* auf ihr chondrogenes Potential zu untersuchen, um die Eignung der CPC für einen zukünftigen Therapieansatz zu evaluieren.

Da bereits die Isolation der CPC aus osteoarthrotischem Knorpelgewebe auf ein migratorisches Potential schließen ließ, bestand eine Aufgabe darin, diese Fähigkeit zur Migration näher zu beleuchten und so ein mögliches *In-vivo*-Verhalten dieser Zellen zu erforschen. Nachdem sich das Migrationspotential der CPC *in vitro* bestätigen ließ, stellte sich die Frage, ob die CPC in der Lage sind, selbständig in Knorpelgewebe *ex vivo* einzuwandern. Diese Fähigkeit würde es ihnen ermöglichen geschädigtes Gewebe zu besiedeln und sich innerhalb des Gewebes an den Ort der Schädigung zu begeben. Dies wäre auch eine Grundlage für einen möglichen Einsatz dieser Zellen in einer zukünftigen zellbiologisch basierten, regenerativen Therapie der Osteoarthrose.

Für so einen Therapieansatz müssten die verwendeten Zellen auch innerhalb des zu regenerierenden Gewebes vital erhalten bleiben. Daher wurden die *ex vivo* eingewanderten CPC in einem weiteren Teil dieser Arbeit auf ihre Proliferationsfähigkeit im Gewebe und die Zeitspanne, über die diese Fähigkeit zur Zellteilung aufrechterhalten werden konnte, hin untersucht.

Da es für die Durchführung der *Ex-vivo*-Migrationsversuche notwendig war die CPC mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und in einer Zellkultur zu vermehren, sollte sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit der Frage beschäftigen, ob sich die Fluoreszenzmarkierung oder die Zeit in der Zellkultur auf den chondrogenen Charakter der CPC auswirken würden. Hierfür wurde die Expression einiger ausgesuchter Gene mittels *real-time* quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (rt-qPCR) auf mRNA-Ebene über die Dauer der Zellkultur und nach der Fluoreszenzmarkierung verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden humane chondrogene Progenitorzellen (CPC) untersucht, die aus hyalinem Kniegelenksknorpel in Spätstadien der Osteoarthrose isoliert wurden. Das hierfür benötigte Knorpelgewebe, wurde während eines operativen Eingriffs im Rahmen eines Gelenkersatzes mit Totalendoprothese von insgesamt sechs Patienten gewonnen (Tabelle 1, Fall 1 - 6).

<u>Fallnummer</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Geburtsjahr</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Größe</u>
1	männlich	1926	95	193
2	weiblich	1925	94	168
3	männlich	1933	90	179
4	weiblich	1932	70	158
5	weiblich	1930	84	168
6	weiblich	1934	90	166

Tabelle 1: klinische Charakteristika der Fälle zur CPC-Isolierung. Geschlecht: gibt das Geschlecht der Knorpelspender an. Geburtsjahr: gibt das Geburtsjahr der Knorpelspender an. Gewicht: gibt das Körpergewicht in kg der Knorpelspender zum Zeitpunkt der Operation an. Größe: gibt die Körpergröße in cm der Knorpelspender zum Zeitpunkt der Operation an.

Für die Ex-vivo-Migrationsversuche wurden zudem Stanzbiopsien aus hyalinem Kniegelenksknorpel aus Spätstadien der Osteoarthrose verwendet. Hierzu wurden von weiteren acht Patienten Kniegelenke während des vorgenannten operativen Eingriffs gewonnen (Tabelle 2, Fall A-H).

Alle Patienten wurden entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Göttingen über die Probenentnahme informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

<u>Fall</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Geburtsjahr</u>	<u>Gewicht</u>	<u>Größe</u>	<u>Bereich</u>
A	weiblich	1929	65	162	R + G
B	männlich	1928	110	178	R + G
C	weiblich	1936	70	168	R + G
D	weiblich	1929	55	157	R + G
E	weiblich	1937	90	172	R
F	weiblich	1932	75	161	R
G	weiblich	1947	90	165	R
H	männlich	1948	90	178	R

Tabelle 2: klinische Charakteristika der Fälle zur Stanzzylinderentnahme. Geschlecht: gibt das Geschlecht der Knorpelspender an. Geburtsjahr: gibt das Geburtsjahr der Knorpelspender an. Gewicht: gibt das Körpergewicht in kg der Knorpelspender zum Zeitpunkt der Operation an. Größe: gibt die Körpergröße in cm der Knorpelspender zum Zeitpunkt der Operation an. Bereich: gibt die Region der Knorpelprobe an, aus der ein Stanzzylinder entnommen wurde, G: G-Knoprel, d. h. makroskopisch noch unauffälliges Knorpelgewebe, R: R-Knorpel, d. h. an den osteoarthrotischen Hauptdefekt angrenzender Randbereich.

2.2 Methoden der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen und den Gewebematerialien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand unter kontrollierten Bedingungen, bei 37°C, mit 5 % CO₂-Gehalt und mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 %, in einem Zellkulturschrank statt.

2.2.1 Gewinnung von CPC-Kulturen aus Knorpel

Die Gewebeproben wurden im Operationssaal sofort nach der Entnahme in eine sterile Lösung gegeben und falls eine Weiterverarbeitung am selben Tag nicht möglich war über Nacht bei 4°C in dieser Lösung gelagert. Die Lösung bestand zu gleichen Teilen aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Zellkulturmedium, das aus Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10 % *fetal bovine serum* (FBS), Penicillin/Streptomycin (50.000 U / 50 mg), 10 mM L-Glutamin zusammengesetzt war. Im nächsten Schritt

wurden die Gewebeproben mit sterilem PBS-Puffer gewaschen bis sie frei von Blut- und Fettresten waren.

Um eine CPC-Zellkultur zu erhalten wurden mit einem Skalpell 8 bis 15 mm³ messende Gewebestücke aus der Knorpeloberfläche des an den Hauptdefekt angrenzenden Randbereichs geschnitten und in 75 cm² Zellkulturflaschen (SARSTEDT) mit Medium inkubiert. Nach zehn Tagen wurden die aus den Knorpelstücken ausgewachsenen Zellen gesammelt und mit einer Dichte von 10³ Zellen pro cm² in eine Monolayerkultur ausgesät.

Ein Wechsel des Mediums fand alle zwei Tage statt.

2.2.1 Passagieren der Zellen

Eine Passage wurde als eine zeitliche Phase des Zellwachstums definiert, die durch Ablösung der Zellen bei einem Konfluenzgrad von ca. 70 % beendet wurde. Die Passage 0 entsprach den emigrierten CPC nach erstmaliger Aussaat. Die CPC wurden von Passage 0 bis zu Passage 4 kultiviert.

Die für das Passagieren der Zellen benötigten Lösungen wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend wurden die folgenden Schritte durchgeführt.

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen um Reste von FBS zu entfernen, das die Wirkung des Trypsins im nachfolgenden Schritt hemmen würde. Hiernach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 10 min im Brutschrank inkubiert, um sowohl die Zell-zu-Zellkontakte zu spalten als auch die Zellen von dem Gefäßboden abzulösen. Danach wurden 5 ml Medium hinzugegeben, um die Trypsinaktivität zu inhibieren. Ab der zweiten Passage wurde anstelle von Trypsin ein Zellschaber (SARSTEDT) zum Ablösen der Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (SARSTEDT) pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Zum Abschluss wurden die Zellzahl mit

einem Zellzählautomaten (Cellometer Auto T4, Peqlab) bestimmt und die Zellen in einer Dichte von 10^3 Zellen pro cm^2 erneut ausgesät.

2.3 Transfektion

Die Transfektion stellt eine Methode dar um fremde Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzubringen. Hierbei unterscheidet man die stabile, bei der das eingebrachte Material fest in das Genom der Zelle integriert wird, von der transienten Transfektion, die zu einer vorübergehenden Expression des transfizierten Materials führt. Für die verschiedenen Arten von Zellen und die verschiedenen Anforderungen an die Transfektion existieren unterschiedliche Transfektionsverfahren. In dieser Arbeit wurde zur Erzielung einer transienten Transfektion die Nukleofektion (Nucleofector® technology, amaxa biosystems) verwendet, da sie besonders für die Transfektion von primären Zellen – wie den hier verwendeten CPC – geeignet ist. Die Nukleofektion beruht auf der Elektroporationsmethode. Es werden durch elektrische Spannungsimpulse vorübergehend Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die dann die Nukleinsäuren in das Zytoplasma und den Zellkern gelangen.

2.3.1 Durchführen der Transfektion

Die Transfektion der CPC (Tabelle 1) erfolgte in Passage 1 unter Verwendung des Human Chondrocyte Nucleofector Kit (amaxa biosystems). Um die CPC für die Ex-vivo-Migration mit einer Fluoreszenz zu markieren, wurde der im Kit enthaltene Kontrollvektor pmaxGFP verwendet. Der pmaxGFP-Vektor kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein (maxGFP), das in der Natur bei den Ruderfußkrebsen *Pontellina plumata* (Arthropoda; Crustacea; Maxillopoda; Copepoda) vorkommt.

Die Transfektion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Benötigte Reagenzien / Vorbereitungen
 - Human Chondrocyte Nucleofector Solution (amaxa biosystems) bei Raumtemperatur

- PBS bei Raumtemperatur
- DMEM mit 20 % FBS bei 37°C (500 ml pro Probe)
- 25 cm² Zellkulturflasche (SARSTEDT) mit 3,5 ml DMEM plus 20 % FBS im Brutschrank erwärmen
- CPC in P1 bei ca. 70 % Konfluenz
- Vorgehen
 - Das Medium der CPC absaugen
 - Die Zellen mit PBS waschen
 - Die CPC mit einem Zellschaber ablösen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen
 - Die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
 - Den Überstand verwerfen und die CPC in 1 ml PBS resuspendieren
 - Die Zellzahl mittels eines Zählautomaten ermitteln
 - 5×10^5 CPC für die Transfektion verwenden
 - Die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
 - Den Überstand verwerfen
 - Die CPC in 100 µl Human Chondrocyte Nucleofector Solution resuspendieren
 - Die Zellsuspension mit 5 µl pmaxGFP-Vektor (0,5 µg/µl in 10 mM TRIS bei pH 8,0) mischen und sofort in eine Transfektionsküvette (amaxa biosystems) überführen
 - Die Küvette in den Nucleofector (amaxa biosystems) stellen und das Programm U-24 starten
 - Nach Beendigung des Transfektionsprogramms unmittelbar 500 µl 37°C warmes DMEM mit 20 % FBS hinzufügen
 - Die Zellsuspension mit einer Pipette (amaxa biosystems) in eine vorbereitete Zellkulturflasche überführen
 - Die CPC im Brutschrank kultivieren und nach 24 Std. das Medium auf das Zellkulturmedium umstellen

2.3.2 Ermitteln der Transfektionsrate

Vierundzwanzig Stunden nach erfolgter Transfektion der CPC wurden die jeweiligen Transfektionsraten im Zuge des Mediumwechsels ermittelt. Hierfür wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops für Zellkulturen (Axiovert 40 CFL, Zeiss) sechs Gesichtsfelder mit 20facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurde der Anteil der grün fluoreszierenden und somit transfizierten CPC an der Gesamtheit der gezählten vitalen CPC bestimmt und hieraus die Transfektionsrate errechnet. Zudem wurden Aufnahmen von einzelnen Gesichtsfeldern mit einer an das Mikroskop angeschlossen digitalen Fotokamera (Coolpix MDC, Nikon) angefertigt.

2.3.3 Ermitteln der Transfektionsdauer

Die Bestimmung der Transfektionsdauer erfolgte unter In-vitro-Bedingungen. Die CPC wurden nach der Transfektion im Brutschrank kultiviert und im Abstand von drei Tagen wurde die Expression des maxGFP mit einem Fluoreszenzmikroskop für Zellkulturen überprüft. Der Zeitpunkt, an dem keine grün fluoreszierenden CPC mehr zu beobachten waren, wurde als Ende der Transfektionsdauer gesetzt. Zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten wurden Aufnahmen von einzelnen maxGFP-positiven CPC mit einer an das Mikroskop angeschlossen digitalen Fotokamera (Coolpix MDC, Nikon) angefertigt.

2.4 Untersuchungen zum Migrationspotential

2.4.1 In-vitro-Migrationsassay

Um das mögliche Verhalten der CPC *in vivo* und damit auch ihre Einsatzmöglichkeiten für spätere Therapieansätze in der Behandlung der Osteoarthrose zu erforschen, wurden die CPC einem In-vitro-Migrationsassay unterzogen. Unter diesem Gesichtspunkt wurden sowohl nicht transfizierte CPC als auch mit maxGFP transfizierte CPC auf ihr Migrationspotential hin untersucht.

Für die Durchführung des In-vitro-Migrationsassay wurde ein Zweikammersystem mit einer Porengröße von 8 nm (CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay, Cell Biolabs) verwendet. Hierbei befanden sich die Zellen in einer inneren Kammer, die in einer äußeren Kammer schwamm, die mit Medium, das FBS oder einen anderen Lockstoff enthielt, gefüllt war. Die innere Kammer wurde durch eine Polykarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 nm von der äußeren Kammer getrennt. Zellen mit der Fähigkeit zur Migration konnten somit durch diese Poren hindurchwandern und waren dann auf der Außenseite der Membran nachzuweisen. Folgende Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellerhandbuchs ausgeführt.

Es wurde je eine Zellsuspension mit den transfizierten und den nicht transfizierten CPC in serumfreiem Medium mit einer Konzentration von 6×10^5 Zellen pro ml angefertigt. Dann wurden die äußeren Kammern jeweils mit 500 µl Medium einmal ohne Serum, einmal mit 10 % FBS, einmal mit TGF-β3 und einmal mit BMP-6 gefüllt. Die entsprechenden inneren Kammern wurden jeweils mit 300 µl der Zellsuspensionen angefüllt und der Assay im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden das Medium und die verbleibenden Zellen aus der inneren Kammer entfernt und der Einsatz in einem sauberen Well mit 400 µl der mitgelieferten Cell Stain Solution (Cell Biolabs) für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die Einsätze mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Abschließend wurden die Zellen ausgezählt.

2.4.2 Ex-vivo-Migration

In diesem Teil der Arbeit sollte die Fähigkeit der CPC *ex vivo* zu migrieren untersucht werden. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte CPC auf die Oberfläche von Knorpelstanzbiopsien aufgebracht und zu vorher festgelegten Zeitpunkten überprüft, ob und in welche Tiefe die Zellen eingewandert waren.

Die Stanzbiopsien zur Durchführung der Ex-vivo-Migrationsversuche wurden aus humanem osteoarthrotischem Kniegelenksknorpel entnommen. Ein Stanzzylinder bestand aus Knorpelgewebe und dem sich in der Probe darunter anschließenden Knochengewebe. Zunächst wurden für jeden Versuchsansatz (Fallnummern A-C) zwei Stanzzylinder aus unterschiedlichen Bereichen des Knorpels entnommen. Zum einen wurde eine Biopsie aus makroskopisch noch unauffälligem Knorpelgewebe (G-Bereich), zum anderen ein Zylinder aus dem an den osteoarthrotischen Hauptdefekt angrenzenden Randbereich (R-Bereich) entnommen. Hierbei wurde zusätzlich darauf geachtet, dass die Oberfläche der Stanzungen möglichst horizontal ausgerichtet war. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde für die zusätzlich durchgeführten Versuchsansätze (Fallnummern E-H) jeweils ein Stanzzylinder aus R-Bereichen entnommen. Die klinischen Charakteristika der Fälle zur Stanzzylinderentnahme sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2.4.2.a Entnahme der Stanzzylinder

Die Gewebeproben für die Knorpelstanzbiopsien wurden im Operationssaal sofort nach der Entnahme in einer sterilen Lösung (PBS und Zellkulturmedium zu gleichen Teilen) gelagert. Die Stanzzylinderentnahme erfolgte stets am Tag der Operation. Hierfür wurden die Gewebeproben zunächst mit PBS von Blut- und Fettresten befreit und im Anschluss die Biopsien mit einem dafür angefertigten Stanzgerät (Anfertigung der technischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen) entnommen. Das Stanzgerät wurde aus chirurgischem Stahl gefertigt. Der Aufbau des Gerätes bestand aus einem Griffstück in T-Form und mehreren Hülsen, die mit einem Bolzen an dem Griffstück befestigt werden konnten. Die Hülsen hatten einen Durchmesser von 1,2 cm und eine Höhe von 3 cm. Der untere Rand der Hülsen war angeschliffen, so dass eine scharfe Schnittkante entstand. Die Lagerung des Stanzgerätes und der Hülsen erfolgte in 70 %igem Ethanol. Vor der Stanzzylinderentnahme wurden die Hülsen mit steriler PBS-Lösung gespült.

Nach der Biopsie wurden die Hülsen mit den Knorpelproben bis zur Weiterverarbeitung in Deep-Well-Platten mit Zellkulturmedium bedeckt gelagert. Bis zum Aufbringen der CPC wurde das Medium täglich gewechselt.

2.4.2.b Durchführen der Ex-vivo-Migrationsversuche

Die Ex-vivo-Migrationsversuche wurden jeweils am dritten Tag nach der Transfektion der CPC und 48 bis 72 Std. nach den entsprechenden Stanzzylikerentnahmen begonnen. Den CPC-Populationen (Fallnummern 1-3 und 5-6) wurden Knorpelproben eines Patienten (Fallnummern A-C und E-H) zugeordnet.

Eine Übersicht zur Struktur der Ex-vivo-Migrationsversuche gibt Tabelle 3.

<u>Knorpelproben</u>	<u>CPC-Population</u>	<u>Stanzzyliker</u>	<u>Zeitpunkte</u>
A	1	1x R; 1x G	Tag 5, 9, 14
B	2	1x R; 1x G	Tag 5, 9, 14
C	3	1x R; 1x G	Tag 5, 9, 14
E	5	1x R	Tag 2
F	6	1x R	Tag 2
G	5	1x R	Tag 3
H	6	1x R	Tag 3

Tabelle 3: Struktur der Ex-vivo-Migrationsversuche. Knorpelprobe: gibt den Fall an aus dem das Knorpelgewebe des verwendeten Stanzzyliker stammt. CPC-Population: gibt die Fallnummer des Knorpelgewebes an, aus der die für den jeweiligen Stanzzyliker verwendete CPC-Population stammt. Stanzzyliker: gibt den Knorpelbereich und die Anzahl der entnommen Stanzzyliker an. Zeitpunkte: gibt die jeweiligen Beobachtungszeitpunkte an, an denen eine Einwanderungstiefenmessung erfolgte.

Für das Aufbringen der CPC auf die Knorpelstanzbiopsien wurden die CPC durch den Einsatz eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die CPC in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit einem Zellzähler bestimmt.

Anschließend wurden jeweils 50.000 CPC auf die Knorpeloberfläche eines Stanzzylinders aufgebracht. Die Hülsen sorgten hierbei dafür, dass die Zelllösung auf der Oberfläche verblieb. Nach dem Aufbringen der Zellen wurden das Well, in dem sich die Stanzung befand, und die Hülse vorsichtig mit Medium gefüllt. Es wurde dabei streng darauf geachtet, dass sich die beiden Kompartimente nicht vermischten. Die Versuchsansätze wurden im Brutschrank inkubiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte das erste Mal nach drei Tagen und nachfolgend alle zwei Tage. Am dritten Tag der Migrationsversuche wurden die Stanzungen aus den Hülsen gelöst und weiter kultiviert. Ausnahmen hierzu stellten die Versuchsansätze der Fallnummern E und F dar, bei denen die Ex-vivo-Migrationsversuche bereits am zweiten Tag endeten. Die Migrationstiefe wurde zu vorher festgelegten Zeitpunkten (siehe Tabelle 3) untersucht. Hierfür wurde in den Versuchsansätzen mit den Fallnummern A bis C an den Tagen 5, 9 und 14 jeweils ein Viertel des Knorpels mit einem Skalpell herausgetrennt und vom Knochen gelöst. In den Versuchsansätzen E bis H endeten die Ex-vivo-Migrationsversuche an den ersten Messzeitpunkten. In diesen Fällen wurde der Knorpel mit einem Skalpell halbiert und vom Knochen abgelöst. Nach dem Herauslösen wurden die Knorpelproben zum Fixieren für 20 Std. in gepuffertem Formalin bei 4°C gelagert. Das Verhältnis von Probenvolumen zu Fixans betrug hierbei mindestens 1 zu 10.

2.5 Immunfluoreszenzhistochemie

Mit der Immunfluoreszenzhistochemie sollte nachgewiesen werden, ob und wie tief die grün fluoreszierenden CPC in den Knorpel eingewandert waren. Des Weiteren wurde überprüft, ob die eingewanderten CPC im Gewebe proliferationsfähig blieben und wie lange sie *ex vivo* diese Fähigkeit behielten. Als Proliferationsmarker wurde das humane Ki-67-Protein gewählt, welches mit einem monoklonalen Antikörper (Ki-67 Antikörper Klone MIB-1, Dako) detektiert wurde. Das Ki-67-Protein befindet sich im Zellkern und wird von allen proliferationsfähigen Zellen sowohl in den G₁-, S-, G₂-

Phasen, als auch während der Mitose exprimiert. Zellen der G₀-Phase zeigen dieses Protein nicht. Um eine Unterscheidung der eingewanderten von den ortständigen Zellen zu ermöglichen, wurde der Ki-67-Antikörper durch einen zweiten Antikörper (Anti-Mouse IgG, BD Pharmingen), der an rot fluoreszierendes Phycoerythrin (PE) als Fluorochrom gekoppelt war, sichtbar gemacht. Somit sollten eingewanderte CPC sowohl eine grüne als auch eine rote Fluoreszenz zeigen. Die Zellkerne wurden durch 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), einem blau fluoreszierenden Fluorochrom, das an die AT-reichen Regionen in den kleinen Schleifen der DNA anlagert, dargestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Licht einer für das jeweilige Fluorochrom spezifischen Wellenlänge zum Leuchten angeregt. Das dafür benötigte Anregungslicht wurde aus dem von einer Quecksilberdampfampe erzeugten Licht mittels eines Anregungsfilters herausgefiltert. Um nur die Fluoreszenz zu beobachten, wurde das langwelligere, von den Fluorochromen emittierte Licht durch einen dichroischen Spiegel und einen in den Strahlengang eingeschobenen Sperrfilter von dem kurzwelligen Anregungslicht getrennt.

Für die Auswertung der angefertigten Schnittpräparate und das Erstellen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurden ein Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M (Zeiss) mit der dazugehörigen digitalen Software AxioVision Re. 4.6 (Zeiss) und eine an das Mikroskop angeschlossene digitale Fotokamera (AxioCamMR, Zeiss) verwendet.

2.5.1 Einbettung in Paraffin

Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben zur Dehydrierung für 3 Std. in 70 %igem Ethanol gelagert. Anschließend wurden die Proben in einem Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Elliott Ltd.) weiter dehydriert und in Paraffin überführt. In Tabelle 4 ist das Protokoll zur Einbettung der Knorpelstücke dargestellt.

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Verwendete Lösung</u>	<u>Dauer [Std.]</u>
1	70 % Ethanol	3
2	80 % Ethanol	1
3	90 % Ethanol	1
4	96 % Ethanol	1
5	Absolut Ethanol	2
6	Isopropylalkohol	2
7	Isopropylalkohol	1,5
8	Xylol	0,5
9	Xylol	0,75
10	Xylol	0,75
11	Paraplastplus® (52°C)	6
12	Paraplastplus® (56°C)	7

Tabelle 4: Einbettprotokoll

Nach Beendigung des Einbettprozesses durch den Einbettautomaten wurden die Gewebeproben an einer Paraffinausgießstation in dafür geeignete Förmchen überführt und auf einer Kälteplatte zum Aushärten des Paraffins gelagert. Die Knorpelstücke wurden so in den Förmchen ausgerichtet, dass die Schnittführung senkrecht zur Knorpeloberfläche erfolgen konnte und die Schnittfläche den Radius der Stanzung darstellte. Außerdem wurde die Position der Knorpeloberfläche der Gewebeproben markiert. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die Paraffinblöcke vorsichtig aus den Förmchen gelöst.

2.5.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Aus den jeweils einem Beobachtungszeitpunkt zugeordneten Paraffinblöcken wurden je 10 Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Jung Biocut 2035, Leica) mit einer Schnittdicke von 14 µm angefertigt. Um eine optimale Entfaltung der Schnitte zu erreichen, wurden diese gleich nach dem Schneiden in ein auf 38°C erwärmtes Wasserbad aus destilliertem Wasser gegeben. Nach zwei bis fünf Minuten wurden die Gewebeschnitte auf

beschichtete Objektträger (Superfrost⁺⁺®, Menzel) überführt. Hierbei wurden die einzelnen Schnitte so ausgerichtet, dass die Knorpeloberfläche stets in dieselbe Richtung wies. Zum Trocknen der Schnitte wurden die Objektträger zuerst auf einer auf 38°C erwärmten Heizplatte gelagert und anschließend in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 37°C für 24 Std. aufbewahrt. Die getrockneten Gewebeschnitte wurden in staubfreien Präparatekästen aufgehoben.

2.5.3 Entparaffinieren und Antigendemaskierung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden vor dem Beginn der Immunreaktionen entparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte nach folgendem Protokoll (Tabelle 5):

<u>Schritt</u>	<u>Verwendete Lösung</u>	<u>Dauer [min]</u>
1	Xylol	5
2	Absolut Ethanol	5
3	96 % Ethanol	5
4	80 % Ethanol	5
5	60 % Ethanol	5
6	50 % Ethanol	5
7	30 % Ethanol	5
8	Destilliertes Wasser	2

Tabelle 5: Protokoll für Entparaffinierung und Rehydrierung

Im Anschluss wurden die Gewebeproben für 10 min in PBS bei 4°C gewaschen. Es folgte die Antigendemaskierung, bei der die Schnitte bei 60°C für 10 min in Pro Taqs (BioCYC GmbH & CoKG) gelagert wurden. Hierdurch sollten die bei der Fixierung entstandenen Proteinvernetzungen gelöst und somit die Antigene für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Antigendemaskierung wurde durch waschen der Proben in PBS bei 4°C für 40 min beendet.

2.5.4 Antikörperreaktionen

Nach der Antigendemaskierung folgte die Immunreaktion mit dem Ki-67-Antikörper. Hierfür wurde der primäre Antikörper im Verhältnis 1 zu 50 in einer 1 %igen (w/v) Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 µl mit einer Pipette auf jeden Schnitt getropft und diese dann über Nacht bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Als Feuchtkammer diente eine Petrischale, in der ein mit destilliertem Wasser durchfeuchtetes Filterpapier ausgelegt worden war und deren Deckel mit Aluminiumfolie umwickelt wurde. Bevor die Immunreaktion mit dem sekundären Antikörper erfolgte, wurden die Gewebeschnitte erst mit PBS gespült und dann für 10 min in PBS bei 4°C gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1 zu 300 mit der 1 %igen (w/v) BSA-PBS-Lösung verdünnt. Es wurden wiederum 100 µl der Antikörperlösung auf jeden Schnitt pipettiert. Die Proben wurden dann 2 Std. in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit PBS gespült und zweimal für je 10 min in PBS bei 4°C gewaschen.

2.5.5 DAPI-Reaktion und Eindecken

Nach den Immunreaktionen erfolgte die Darstellung der Zellkerne mit DAPI. Hierfür wurde DAPI in einem Verhältnis von 1 zu 1000 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 µl mit einer Pipette auf jeden Schnitt aufgebracht. Die Einwirkzeit betrug 15 min in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Danach wurden die Gewebeschnitte erst mit PBS gespült und anschließend für 10 min mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit hydrophilem Non Fade Fluorescent Mounting Medium (DAKO) und Deckgläsern (Menzel) eingedeckt und bis zum Aushärten des Eindeckmediums flach liegend im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Um eine optimale Fluoreszenz zu gewährleisten und ein verfrühtes Ausbrennen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern, wurden die

Gewebeschnitte in staubfreien Präparatekästen bei 4 °C aufbewahrt und möglichst nur beim Mikroskopieren einer Lichteinwirkung ausgesetzt.

2.5.6 Kontrollen

Die Gewebeschnitte, die als Negativkontrolle gelten sollten, wurden wie oben beschrieben entparaffiniert, rehydriert und einem Antigenretrieval unterzogen. Im Zuge der Immunreaktionen wurde die Inkubation mit dem Ki-67-Antikörper weggelassen und stattdessen mit dem sekundären Antikörper fortgeföhren. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass es sich bei einer positiven Testreaktion auf Ki-67 um eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion handelte.

2.5.7 Auswertung und Migrationstiefenmessung

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und einer hieran angeschlossenen Digitalkamera. Von jeder Gewebeprobe eines Beobachtungszeitpunkts wurden stets alle 10 Schnitte auf das Vorkommen von eingewanderten CPC und Ki-67-positiven Zellen untersucht.

Um die Einwanderungstiefe der CPC bestimmen zu können wurden Serienaufnahmen angefertigt, deren Bildausschnitte so gewählt wurden, dass die Knorpelschicht lückenlos von der Oberfläche bis zum Ende der Gewebeprobe dargestellt wurde. Von den Gewebeschnitten eines Messzeitpunktes wurden jeweils mehrere Bilderserien sowie Einzelaufnahmen von ausgewählten Zellen angefertigt. Die Aufnahmen der Bildserien erfolgten in einer 10fachen Vergrößerung. Für die Einzelbilder wurden auch höhere Vergrößerungen gewählt.

Die Ermittlung der Migrationstiefe erfolgte unter Zuhilfenahme der digitalen Bildbearbeitungssoftware Axio Vision Re. 4.6, indem auf den Serienaufnahmen der Abstand der eingewanderten CPC von der Knorpeloberfläche gemessen wurde.

2.6 Molekularbiologische Methoden

In diesem Teil der Arbeit sollte zum einen anhand der Expression von einigen ausgesuchten Genen untersucht werden, in welche Differenzierungsrichtung die CPC *in vitro* tendieren. Es wurden Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan, sox-9, ADAMTS-5, MMP-13 und runx-2 als „Markergene“ verwendet, wobei Kollagen II, Aggrecan und sox-9 für eine chondrogene Entwicklungsrichtung standen. Die Gene Kollagen I, ADAMTS-5, MMP-13 sowie runx-2 galten als Indikatoren für eine fibroblastische Differenzierung.

Zum anderen sollte erforscht werden, inwiefern sich die Kultivierung und die Transfektion der CPC auf die Expression dieser Gene auswirkten. Hierfür wurde aus den Zellen während jeder der vier Passagen (P0, P1, P2, P3) und nach der Transfektion (P2+maxGFP, P3+maxGFP) mRNA isoliert, diese in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend mit der rt-qPCR untersucht.

Für beide Beobachtungsansätze wurden die CPC-Populationen der Fälle 1 bis 4 verwendet.

2.6.1 Isolation von mRNA

Die Isolation der mRNA aus den CPC-Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kit der Firma QIAGEN. Hierbei erfolgt die Gewinnung der mRNA nach folgendem Prinzip. Um die mRNA aus den Zellen isolieren zu können, müssen die Zellen zunächst lysiert und die RNasen inaktiviert werden. Dies geschieht durch einen guanidinthiocyanathaltigen Puffer (RLT-Puffer). Das Lysat wird mechanisch weiter homogenisiert (QIA-Shredder *spin column*) und mit Ethanol gemischt um optimale Bindungsbedingungen herzustellen. Die Lösung wird durch eine spezielle Silicatmembran (RNeasy *spin column*), an die die RNA bindet, zentrifugiert. Hiernach wird die mit RNA beladene Membran mehrfach gewaschen, wobei RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nukleotiden entfernt werden, so dass allein die mRNA gebunden bleibt. Zuletzt wird die mRNA in RNase-freiem Wasser gelöst.

Es wurden folgende Arbeitsschritte nach Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Als erstes wurden die CPC mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und anschließend für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen. Hiernach wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde auf eine QIA-Shredder *spin column* (QIAGEN) pipettiert und für 2 min mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Danach wurde die Lösung vorsichtig in einem Verhältnis von 1 zu 1 mit 70 %igem Ethanol gemischt. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy *spin column* (Säule) gegeben und für 30 sek mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Es folgten verschiedene Waschschrirte. Dabei wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und diese für 30 sek mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Nun wurden auf die Säule 500 µl des RPE-Puffers aufgebracht und diese 30 sek mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Es wurden wiederum 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 2 min mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Hiernach wurde die Rneasy *spin column* für 1 min mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Danach wurden 100 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben, um die dort gebundene mRNA zu lösen und für 1 min mit $13,2 \times 10^3$ rpm bei 23°C zentrifugiert. Das Zentrifugat enthielt nun die mRNA.

Die RNA-Lösung wurde anschließend mit einem Evaporator (Concentrator 5301, Eppendorf) auf ein Volumen von ungefähr 40 µl konzentriert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Um den Reinheitsgrad der isolierten RNA-Lösung zu bestimmen, wurde zusätzlich die optische Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, da hier das Absorptions-

maximum von Proteinen liegt. Der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten der OD 260 nm und der OD 280 nm abgeleitet. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,1 wurde als genügend angesehen.

2.6.3 Synthese von cDNA

Zur weiteren Untersuchung der mRNA-Genexpression musste die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Das Verfahren hierzu beruht auf der Fähigkeit eines viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RT), mit Hilfe eines Primers, einem Oligonukleotid, das an das Poly-A-Ende der mRNA bindet, cDNA-Stränge zu synthetisieren.

Für die Synthese der cDNA wurden das QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) benutzt und die Arbeitsschritte nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach dem Umschreiben der mRNA sollten 200 µl cDNA-Lösung mit einer Konzentration von 1 ng pro µl vorliegen. Hierfür mussten 200 ng mRNA eingesetzt werden. Für jede mRNA-Probe wurde das zu verwendende Volumen errechnet und es wurden jeweils 2 µl gDNA Wipeout Puffer hinzugegeben. Danach wurde die Lösung mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt und für 2 min bei 42°C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Hierdurch wurden mögliche Verunreinigungen der Proben mit genomischer DNA (gDNA) entfernt. Anschließend wurden jeder Probe 4 µl Quantiscript RT Buffer, 1 µl RT Primer Mix und 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde zur Synthese der cDNA für 15 min bei 42°C in einem Thermomixer inkubiert. Nach der cDNA-Synthese wurde der RNA-Matrizenstrang durch die RNase-H-Aktivität – dies ist eine RNase, die nur Hybride aus RNA und DNA angreift – der eingesetzten RT abgebaut. Danach wurden die Proben für 3 min bei 95°C im Thermomixer gelagert, um die RT zu inaktivieren. Die Proben wurden nach dem Abkühlen mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und die cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.6.4 real-time quantitative Polymerase - Kettenreaktion

Die rt-qPCR basiert auf dem Prinzip der Polymerase–Kettenreaktion (PCR), die von Kary B. Mullis erfunden wurde. Im Jahr 1993 wurde ihm für diese Leistung der Nobelpreis für Chemie verliehen (Nobelprize.org. 2013).

Die PCR beruht auf der Fähigkeit von bestimmten Enzymen, den DNA-Polymerasen, mit Hilfe von Oligonukleotiden – den so genannten Primern - , die an den zu kopierenden DNA-Einzelstrang binden, und unter Verwendung von freien Nukleotiden (dNTP) komplementäre DNA-Stränge synthetisieren zu können. Die DNA-Polymerasen replizieren auf diese Weise vor jeder Zellteilung die komplette Erbinformation.

Im Gegensatz dazu ist die PCR ein Verfahren um gezielt bestimmte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Es werden mehrere Zyklen durchlaufen, wobei hohe Temperaturen erreicht werden. Durch den Einsatz einer speziellen hitzestabilen Polymerase konnte der Prozess automatisiert und somit effizienter gestaltet werden. Eine solche Polymerase wurde erstmals in dem Bakterium *Thermus aquaticus* (T.aq.), das in der Natur in heißen Quellen vorkommt, entdeckt und nach ihm Taq-Polymerase benannt.

Für die Durchführung einer PCR benötigt man DNA, die den zu amplifizierenden Abschnitt enthält, zwei Primer, die jeweils vor der gesuchten DNA-Sequenz an einem der DNA-Einzelstränge binden, Taq-Polymerase, dNTP und eine geeignete Pufferlösung.

Der theoretische Ablauf der PCR stellt sich folgendermaßen dar. Es werden in einem Thermocycler mehrere Zyklen durchlaufen, die jeweils aus folgenden Schritten bestehen: Erstens Denaturierung, zweitens Primer-Annealing und drittens Elongation.

In der ersten Phase wird die Probe auf 95°C erhitzt, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen lösen und die DNA sowie die Primer in Einzelsträngen vorliegen. Im zweiten Schritt wird das Gemisch auf eine für die Primer spezifische Temperatur (Annealing-Temperatur) abgekühlt, bei der die Primer an die DNA binden, die DNA aber noch nicht wieder hybridisiert. Es folgt die Elongation. Hierbei wird die Probe auf das

Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erwärmt. Die Polymerase synthetisiert nun ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung den jeweils komplementären Strang. Da im ersten Durchlauf zwar ein Startpunkt, aber noch kein Endpunkt vorliegt, wird die Reaktion nach einer bestimmten Zeit, die sich nach der Länge des zu vervielfältigenden Abschnitts – die Polymerase synthetisiert ca. 500 Basenpaare in 30 sek – richtet, durch den nächsten Zyklus beendet. Mit jedem durchlaufenem Zyklus verdoppelt sich die Menge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Bei der rt-qPCR handelt es um eine Weiterentwicklung der PCR, mit deren Hilfe es möglich ist die Genexpression von Zellen zu messen und während der Reaktion – daher der Name „*real-time*“ – zu quantifizieren.

Hierzu wird mRNA, die das aktuelle Transkriptom der Zellen darstellt, isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA werden dann mit der PCR die gesuchten Sequenzen vervielfältigt. Somit kann nachgewiesen werden, dass bestimmte Gene in den Zellen transkribiert worden sind, eine quantitative Aussage über die Expression dieser Gene ist aber nicht möglich. Ein Gen, dessen Produkt die Zelle stärker exprimiert, wird häufiger transkribiert. Somit führt eine stärkere Genexpression zu einer größeren Menge an mRNA für dieses Gen. Um einen Rückschluss auf die eingesetzte Menge des gesuchten Produkts zu ermöglichen wird dem Reaktionsansatz ein Fluorochrom, in diesem Fall SYBR-Green, zugesetzt. SYBR-Green ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der bei jeder Neusynthese an die entstandenen DNA-Doppelstränge bindet und hierdurch fluoresziert. Nach jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenz gemessen. Es gilt hierbei, je mehr Kopien des gesuchten Abschnitts vorliegen, umso stärker ist die gemessene Fluoreszenz. Eine Quantifizierung der Fluoreszenz ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, wenn optimale Reaktionsbedingungen – richtiges Verhältnis von dNTP, Polymerase und DNA-Matrizensträngen – herrschen. Um den Beginn dieser Phase zu erkennen, wird ein Schwellenwert (*cycle threshold*, Ct-Wert) festgelegt, ab dem die

gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal signifikant übersteigt. Je früher während der PCR der Ct-Wert überschritten wird, desto mehr Ausgangsprodukt befand sich in der Probe, d. h. desto mehr mRNA-Abschriften des gesuchten Gens lagen in den Zellen vor.

2.6.4.a Durchführung der rt-qPCR

Die Durchführung der rt-qPCR erfolgte unter Verwendung eines Thermocyclers (Mastercycler real plex² egradient S, Eppendorf) und des RealMasterMix SYBR ROX 2,5 Kits (5PRIME). Für die Proben wurde jeweils ein Master Mix nach folgendem Ansatz gemischt:

- Master Mix
 - 2,5 µl RNase-freies Wasser
 - 2 µl (20 pmol) Primer Mix (vorwärts und rückwärts)
 - 1 µl cDNA-Probe in einer Konzentration von 1 ng/µl
 - 4,5 µl SYBR-Green

Die rt-qPCR wurde für alle Proben nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 min
2. Denaturierung bei 95°C für 15 sek
3. Primer-Annealing bei der jeweils spezifischen Annealing-Temperatur
4. Elongation bei 68°C für 30 sek
5. Messung des Fluoreszenzsignals der DNA-SYBR-Green-Komplexe
6. Anfertigung einer Schmelzkurve (0,2°C-Schritte von 50°C bis 95°C)

Die Schritte 2 bis 5 wurden 40 Mal hintereinander durchlaufen.

Jede Probe wurde mit drei Reaktionsansätzen in drei verschiedenen Durchgängen gemessen.

2.6.4.b Housekeeping-Gen

Als Housekeeping-Gene (HKG) bezeichnet man Gene, deren Expression konstitutiv und somit weitgehend unabhängig von intra- und extrazellulären Vorgängen erfolgt. Es wird daher angenommen, dass die Expression eines HKG stets konstant bleibt und sich auch durch die Behandlung der Probe

nicht ändert. Daher werden sie als interne Referenzgene herangezogen, um Unterschiede in der Genexpression, die nicht auf einer tatsächlichen Regulation der mRNA-Expression beruhen, sondern methodisch bedingt sind, zu eliminieren. Ein geeignetes HKG muss für jede Probe einzeln ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde beta-2-Mikroglobulin als HKG verwendet, das eine Untereinheit der Major-Histocompatibility-Complex-Klasse-1-Moleküle (MHC 1) bildet, die auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden.

2.6.4.c Primer

Die für die Expressionsanalyse benötigten spezifischen Primer wurden mit Hilfe der Primer3-Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) online berechnet. Die notwendigen Nukleotidsequenzen der untersuchten Gene wurden den Online-Datenbanken der US-amerikanischen Nationalbibliothek für Medizin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) entnommen und in die Primer3-Software eingespeist. Unter Verwendung des Basic-Local-Alignment-Search-Tools (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden alle Primersequenzen auf ihre Spezifität hin überprüft. Es wurden Primer mit einer Länge von 14 bis 25 Basen synthetisiert, die Amplifikationsabschnitte mit einer Länge von maximal 390 Basen eingrenzten. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland).

Die vom Hersteller für die einzelnen Primer angegebenen Annealing-Temperaturen wurden durch eine Gradienten-PCR überprüft. Außerdem wurden mit der Gradienten-PCR die spezifischen Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primerpaare im Bereich von 50°C bis 63°C für den hier verwendeten Reaktionsansatz (RealMasterMix SYBR ROX 2,5; 5PRIME) bestimmt.

Um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu überprüfen, wurden die Produkte durch die Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Anschließend wurden die ermittelten Sequenzen

mit den angegebenen Sequenzen aus den Datenbanken verglichen. Die verwendeten Primer zeigt Tabelle 6.

<u>Zielgen</u>	<u>Richtung</u>	<u>Nukleotidsequenz</u> <u>5' – 3'</u>	<u>Länge</u>	<u>Temperatur</u>
Kollagen I	vorwärts	ttccccagccacaaagagtc	261	61
	rückwärts	cgtcatcgcacacacct		
Kollagen II	vorwärts	ctcctggagcatctggagac	152	63
	rückwärts	accacgatcacccttgactc		
Aggrecan	vorwärts	acagctggggacat	181	60
	rückwärts	gtggaatgcagagg		
sox-9	vorwärts	caggctttgcgatttaagga	155	60
	rückwärts	ccgtttaaggctcaagggtg		
MMP-13	vorwärts	agagtctgcctgtatcct	390	63
	rückwärts	ctatgggccaggagatgaa		
ADAMTS-5	vorwärts	cagcagtgcaacctgacat	161	59
	rückwärts	cagattctccccttccac		
runx-2	vorwärts	ttccagaccagcagcactc	181	63
	rückwärts	cagcgtcaacaccatcatt		
β-2-Mikroglobulin	vorwärts	tgctgtctccatgtttgatgtatct	86	61
	rückwärts	tctctgctccccacctctaa		

Tabelle 6: Eigenschaften der verwendeten Primer. Länge: gibt die Länge in Basenpaaren des entstanden PCR-Produktes an. Temperatur: gibt die Annealingtemperatur in Grad Celsius der verwendeten Primer an.

2.6.4.d Relative Quantifizierung und statistische Analyse

Um die in der rt-qPCR ermittelten Ct-Werte untereinander vergleichbar zu machen und damit eine Aussage über das Expressionsniveau des untersuchten Gens in den verschiedenen Proben treffen zu können, wurde die REST 2009 Software (Relative Expression Software Tool V2.0.13, QIAGEN) verwendet (PFAFFL 2001, PFAFFL et al. 2002, VANDERSOMPLE et al. 2002). Die Software wurde nach den Maßgaben des Benutzerhandbuches (REST 2009 Software User Guide 2009) angewandt.

Die Software berechnet effizienzkorrigierte mittlere relative Expressionsunterschiede (Ratio) eines Zielgens zwischen einer Probe und Kontrolle und normalisiert diese zu der Expression eines Referenzgens (HKG) in der Probe und der Kontrolle. Außerdem führt das Programm eine statistische Analyse der berechneten Ratios mit Hilfe von nicht parametrischen Randomisations- und Bootstrappingtestverfahren durch. Diese Verfahren ermöglichen eine statistische Analyse ohne Annahmen, wie Normalverteilung oder Varianzhomogenität der Daten, vorauszusetzen. Die 95 %-Konfidenzintervalle werden mit Hilfe von Bootstrappingverfahren (StandardEinstellung n = 2000) berechnet und geben Auskunft über die Richtung eines beobachteten Unterschieds. Der von der Software durchgeführte Hypothesentest testet mittels der erwähnten Randomisationstechniken (n = 10000) auf die Zufälligkeit des beobachteten relativen Expressionsunterschiedes und gibt das Ergebnis als p-Wert an. Ein p-Wert von unter 0.05 wurde von der Software als ein signifikanter nicht auf Zufall beruhender mittlerer relativer Expressionsunterschied angegeben.

2.7 Materialien

2.7.1 Verwendete Chemikalien und Kits

<u>Chemikalien / Kits</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
BMP-6	R&D Systems	507-BP-020
BSA	SIGMA	A7638
CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay	Cell Biolabs	CBA-100
DAPI	KPL	70-03-00
sek. Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem	3599
DMEM	Gibco	21885
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134
Ethanol (zum Einbetten)	Chemievertrieb Hannover	2002234
Ethanol	Fura AppliChem	2005786

Material und Methoden

FBS	Gibco	10270-106
Formaldehyd (37 %ig)	Merck	3997
Human Chondrocyte Nucleofector Kit	amaxa biosystems	VPF-1001
Isopropylalkohol	Merck	8187661000
prim. Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	ROTH	3904.1
Non Fade Fluorescent Mounting Medium	DAKO	S 3023
Paraplast plus® (52°C)	ROTH	X.882.1
Paraplast plus® Shandon Histoplast Paraffin (56°C)	THERMO Scientific	6774006
PBS	SIGMA	P4417
Penicillin/Streptomycin (50000units/50mg)	PAN Biotech	P06-07100
Pro Taqs I Antigen-Enhancer (50fach)	BioCYC GmbH & CoKG	401602092
QIA-Shredder spin columne	QIAGEN	79656
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN	205313
RealMasterMix SYBR ROX 2,5	5PRIME	2200800
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74106
TGF-β3	SIGMA	T5425
Xylol	ROTH	CN80.2

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Kits

2.7.2 Verwendete Geräte, Zellkulturgefäße und Hilfsmittel

<u>Geräte / Zellkulturgefäße / Hilfsmittel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
AxioCamMR	Zeiss	
Axiovert 200 M	Zeiss	
Axiovert 40 CFL	Zeiss	
Cellometer Auto T4	Peqlab	91-CMT4
Centrifuge 5415 R	Eppendorf	5426 000.018
Centrifuge 5810	Eppendorf	5810 000.017
Coolpix MDC	Nikon	
Concentrator 5301	Eppendorf	
Deckgläser	Menzel	1871.1
Deep Well Platten 10 ml	Corning Incorporated	P-DW-10ML-24-C-S
Duplex Processor	Shandon Elliott Ltd.	
Gewebekulturflasche 25 cm ²	SARSTEDT	83.1810.002
Gewebekulturflasche 75 cm ²	SARSTEDT	83.1813.002
Heraeus	Schütt Labortechnik	
Herasafe Zellbank	Heraeus Holding GmbH	
Jung Biocut 2035 Mikrotom	Leica	
Mastercycler ep real plex ² gradient S	Eppendorf	6300 000.604
Nucleofector® Device	amaxa biosystems	AAD-1001
Pipetten	Eppendorf	
Rundfilter	ROTH	AP63.1
Skalpell	Techno Cut	4001446
Superfrost ⁺⁺ ®Objektträger	Menzel	H867.1
Thermomixer comfort	Eppendorf	5355 000.011
Zellschaber	SARSTEDT	83.1830
Zentrifugenröhrchen 15 ml	SARSTEDT	62.553.542 PS
Zentrifugenröhrchen 50 ml	SARSTEDT	62.547.254 PP

Tabelle 8: Verwendete Geräte, Zellkulturgefäße und Hilfsmittel

2.7.3 Lösungen

2.7.3.a Ansätze für Phosphatpuffer nach Sörensen

18,2 ml	0,3 M primäres Kaliumhydrogenphosphat (40,872 g KH_2PO_4 in 1000 ml Aqua dest.)
81,8 ml	0,3 M sekundäres Dinatriumhydrogenphosphat (42,588 g Na_2HPO_4 in 1000 ml Aqua dest.)

Tabelle 9: Ansatz für Phosphatpuffer nach Sörensen

Der ph-Wert der Pufferlösung lag bei 7,4.

2.7.3.b Ansatz für gepuffertes Formalin

100 ml	37 %-iges Formaldehyd
900 ml	0,1 M Phosphatpuffer

Tabelle 10: Ansatz für gepuffertes Formalin

2.7.3.c Ansätze für PBS-Lösung und 1 %ige (w/v) BSA-PBS-Lösung

1 Tablette	Phosphat buffered saline
1000 ml	Aqua dest.

Tabelle 11: Ansatz für PBS-Lösung

10 ml	PBS-Lösung
0,1g	Albumin from Bovine Serum (BSA)

Tabelle 12: Ansatz für 1 %ige (w/v) BSA-PBS-Lösung

2.7.4 Verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Kopplung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
Anti-Human Ki-67-Antigen, Klon MIB-1	Nicht gekoppelt	Maus monoklonal, Isotyp IgG ₁ K	Dako	M7240
Anti-Mouse IgG ₁ K, Klon MOPC-21	PE	Ratte	BD Pharmingen	555749

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

3. Ergebnisse

3.1 Transfektion

In diesem Teil der Arbeit wurde in den humanen chondrogenen Progenitorzellen durch Nukleofektion die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (maxGFP) induziert. Die Fluoreszenzmarkierung sollte in den Ex-vivo-Migrationsversuchen eine Unterscheidung zwischen eingewanderten CPC und den ortsständigen Chondrozyten ermöglichen. Die Abbildung 1 zeigt exemplarisch In-vitro-Aufnahmen von CPC aus Fall 3 nach erfolgter Transfektion.

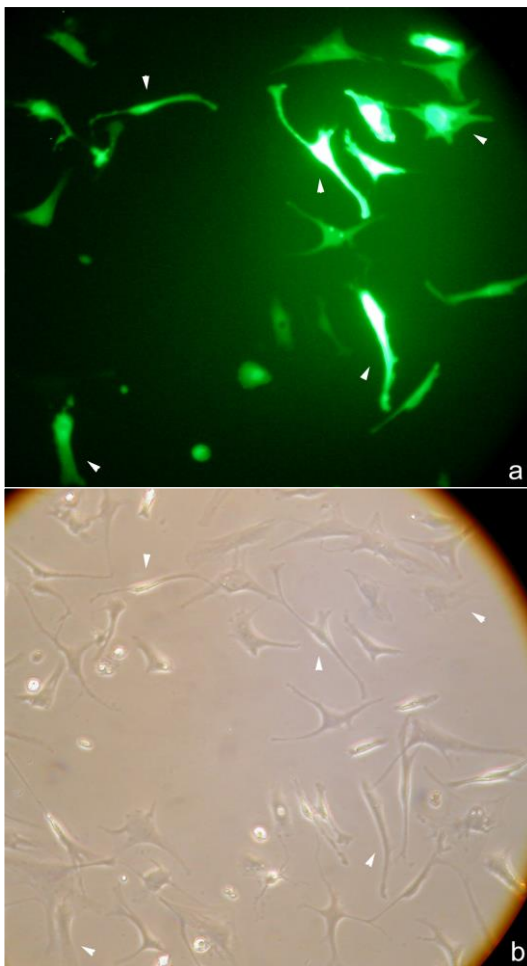


Abbildung 1: CPC aus Fall 3 unter Zellkulturbedingungen nach der Transfektion mit maxGFP.

- a) Die Aufnahme zeigt einen Bildausschnitt unter 20facher Vergrößerung im Fluoreszenzlicht. Es sind mehrere grün fluoreszierende und damit erfolgreich transfizierte CPC zu erkennen. Die Pfeilspitzen markieren einige dieser Zellen.
- b) Darstellung desselben Bildausschnitt aus Abb.1a) in gleicher Vergrößerung ohne Fluoreszenzlicht. Die Pfeilspitzen weisen auf dieselben Zellen aus Abb.1a).

3.1.1 Transfektionsraten

Der Erfolg der Transfektion, gemessen an dem Anteil der grün fluoreszierenden CPC an den überlebenden Zellen, betrug im Mittel 76 %. In allen Fällen war zu beobachten, dass im Zuge der Transfektion ungefähr die Hälfte der eingesetzten Zellen einging. Es zeigten sich jedoch interindividuelle Unterschiede in der Effizienz der Transfektion. So betrug die Transfektionsrate in Fall 1 rund 81 %. Im Fall 2 war ein Transfektionserfolg von 67 % zu beobachten. In den Fällen 3 und 4 ließen sich Transfektionsraten von jeweils 77 % erzielen.

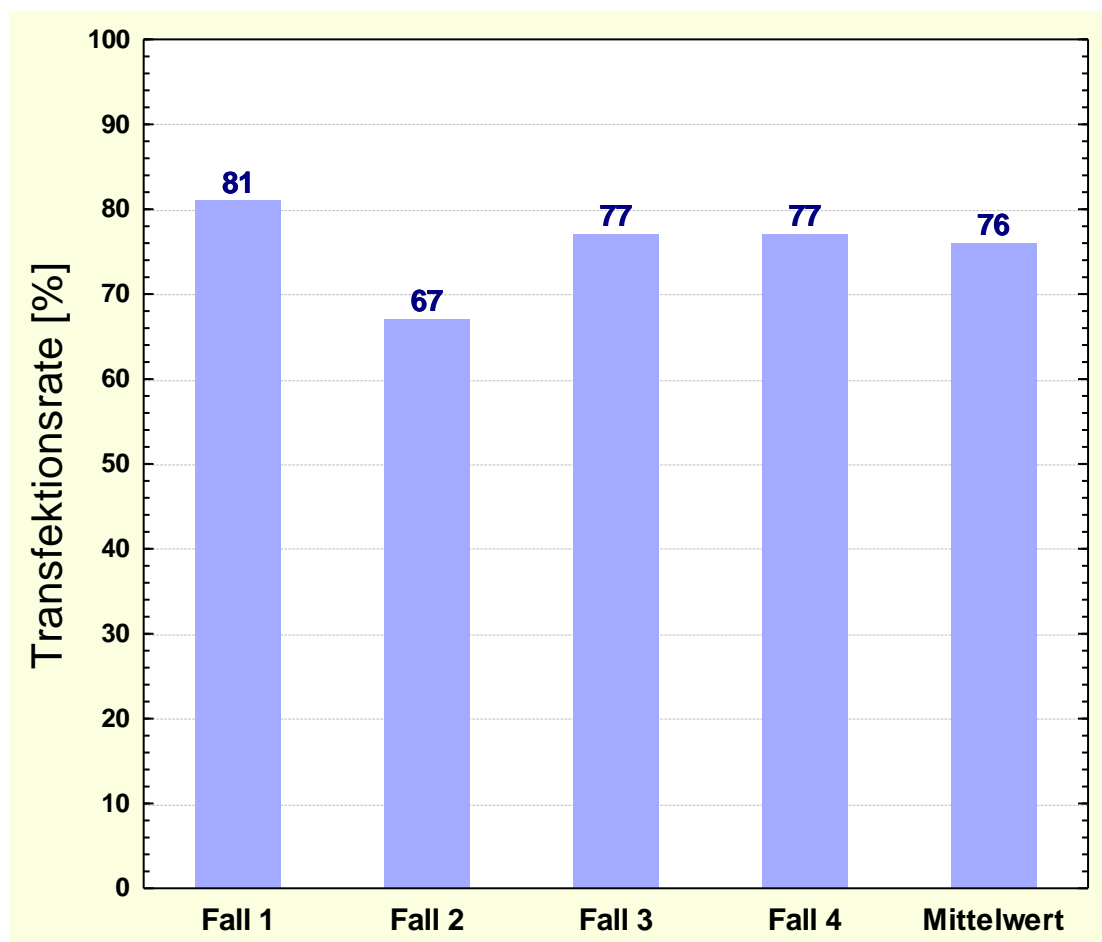


Abbildung 2: Erzielte Transfektionsraten in den einzelnen CPC-Populationen und der Mittelwert der Transfektionsraten aus den CPC-Populationen von Fall 1 bis Fall 4.

3.1.2 Transfektionsdauer

Da es sich bei der Nukleofektion um eine transiente Transfektionsmethode handelt, sollte zunächst *in vitro* die Zeitspanne, die die Expression des maxGFP anhält, bestimmt werden. Zur Ermittlung der Transfektionsdauer wurde ein Teil der transfizierten Zellen, die aus Fall 1 bis Fall 4 stammten, unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Der Zeitraum, in dem die CPC maxGFP exprimierten, variierte auch hier von Fall zu Fall. Während in Fall 1 noch an Tag 38 vereinzelt grün fluoreszierende Zellen gefunden werden konnten, waren solche Zellen in Fall 2 nur bis Tag 24 nachweisbar. Bei Fall 3 hielt die Transfektion in einigen Zellen bis zum Tag 32 an und im vierten Fall konnten bis zum 34. Tag maxGFP positive Zellen beobachtet werden.

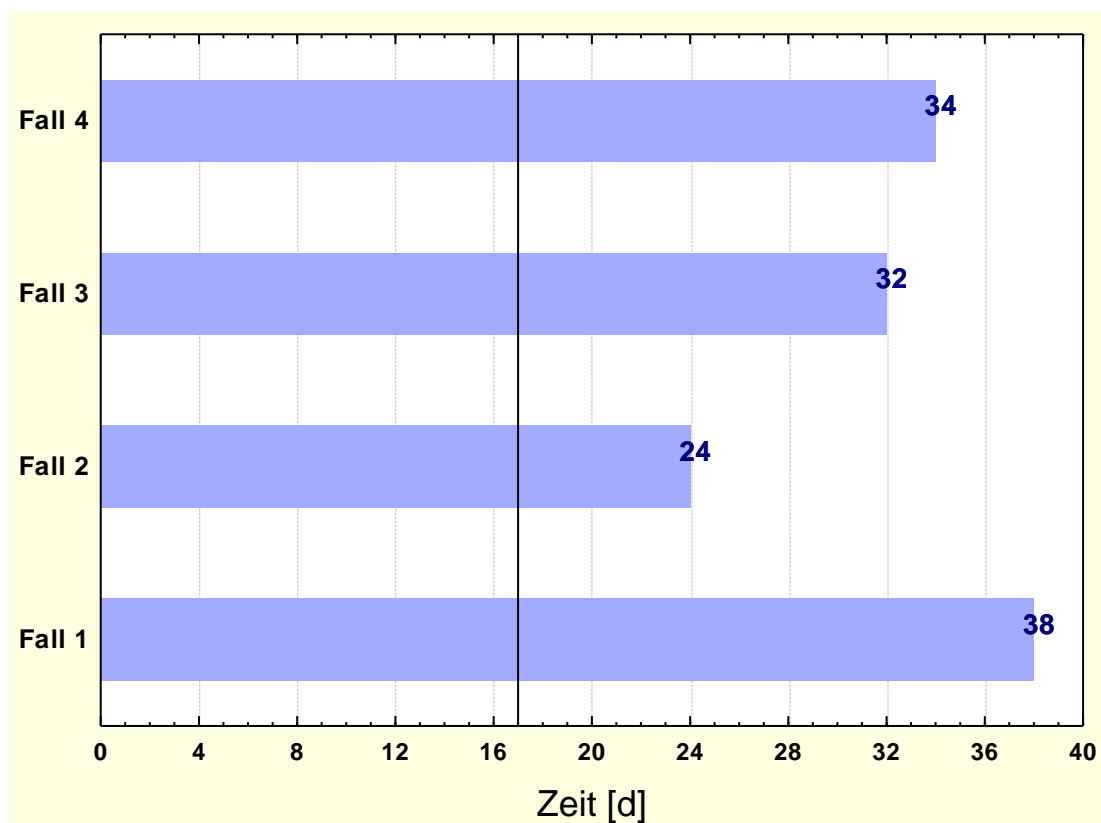


Abbildung 3: Dauer der Transfektion in den CPC-Populationen aus Fall 1 bis Fall 4 *in vitro*. Die Markierung bei Tag 17 zeigt die maximale Dauer der Ex-vivo-Migrationsversuche vom Zeitpunkt der Transfektion an.

Anschließend wurde die Transfektionsdauer der CPC im Knorpelgewebe untersucht. Hierbei konnten bis zum 14. Tag der Ex-vivo-Migrationsversuche maxGFP positive Zellen beobachtet werden.

3.2 Migrationspotential

Um das mögliche In-vivo-Verhalten der CPC besser zu verstehen und um potentielle Einsatzmöglichkeiten der CPC in zukünftigen Therapiestrategien der Osteoarthritis zu prüfen, wurden die CPC auf die Fähigkeit zur Migration untersucht. Hierzu wurden zunächst ein In-vitro-Migrationsassay und darauf Ex-vivo-Migrationsversuche durchgeführt.

3.2.1 Migration in vitro

In dem durchgeführten Migrationsassay zeigte sich, dass sowohl die CPC als auch die transfizierten CPC in der Lage sind *in vitro* zu migrieren. Die weiteren Untersuchungen ergaben keinen Unterschied zwischen dem Migrationsverhalten der CPC und dem der transfizierten CPC, aber deutliche Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen verwendeten Lockstoffe. In den Versuchen ohne FBS im Medium wanderten im Mittel 9653 CPC und 10032 transfizierte Zellen durch die Membran. Von den verwendeten Lockstoffen war das Medium, dem 10 % FBS zugesetzt worden war, am effektivsten. Hier wanderten ungefähr viermal so viele Zellen wie in den Fällen ohne FBS. Der Einsatz von TGF- β 3 führte im Vergleich zu den Fällen ohne FBS zu einer annähernden Verdoppelung der Anzahl an migrierten CPC. Auch die Verwendung von BMP-6 ließ die CPC durch die Membran wandern, jedoch in einem deutlich geringeren Maße als bei den übrigen eingesetzten Lockstoffen. Eine Übersicht über die Ergebnisse des In-vitro-Migrationsassays gibt die Abbildung 4.

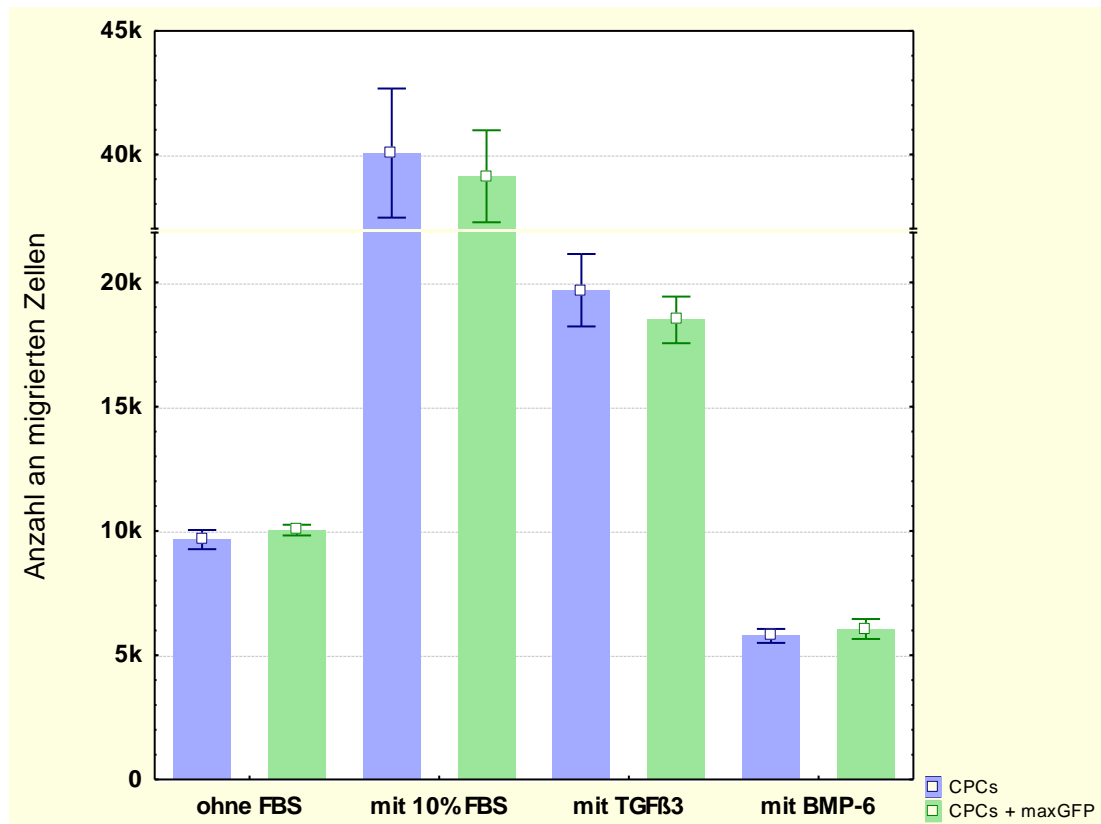


Abbildung 4: In-vitro-Migration von CPC und transfizierten CPC. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.2.2 Migration ex vivo

In diesem Teil der Arbeit sollte nun das Migrationspotential der CPC *ex vivo* im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzung näher untersucht werden. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte CPC auf die Oberfläche von osteoarthrotischem Knorpelgewebe aufgebracht.

3.2.2.a Einwanderungstiefe im G-Knorpel

Die Dauer der Ex-vivo-Migrationsversuche im G-Knorpel betrug 14 Tage mit Beobachtungszeitpunkten am fünften, neunten und vierzehnten Tag nach Aufbringen der fluoreszenzmarkierten CPC (Fall 1, 2, 3) auf die Knorpelstanzenoberflächen (Fall A, B, C).

Im ersten Fall erreichten die CPC am fünften Tag eine mediane Einwanderungstiefe von 858 μm und fünfzig Prozent der erfassten Zellen

befanden sich in einer Tiefe zwischen 532 μm und 1129 μm . Die oberflächlichsten und tiefsten Zellen lagen bei 30 μm bzw. 1547 μm . Im Fall 2 lag zu diesem Zeitpunkt eine mediane Einwanderungstiefe von 957 μm vor. Die 25 %- und 75 %-Perzentilen lagen bei 524 μm und bei 1196 μm . Die am weitesten eingedrungene Zelle befand sich bei 1666 μm , wobei eine minimale Einwanderungstiefe von 56 μm gemessen werden konnte. Zum ersten Messzeitpunkt wiesen die CPC des dritten Falls einen medianen Wert für die Migrationstiefe von 1406 μm auf. In einem Bereich von 937 μm bis 1807 μm waren 50 % der Zellen zu finden. Die Zelle mit der geringsten Eindringtiefe befand sich bei 27 μm und die am weitesten gewanderte Zelle aus diesem Fall konnte in 2254 μm Tiefe nachgewiesen werden.

Am neunten Tag der Migrationsversuche wurden im ersten Fall eine mediane Migrationstiefe von 948 μm und 50 % der CPC im Bereich von 511 μm bis 1399 μm gemessen. Die minimale Eindringtiefe betrug 187 μm und die maximale Tiefe lag bei 1847 μm . Die fluoreszenzmarkierten Zellen des zweiten Falls zeigten an Tag 9 einen Eindringtiefenmedian von 1284 μm . Der Abstand der am wenigsten migrierten Zelle von der Knorpeloberfläche betrug 222 μm und die maximale gemessene Tiefe einer CPC lag bei 2074 μm . Fünfzig Prozent dieser CPC konnten in einer Tiefe zwischen 1015 μm und 1612 μm nachgewiesen werden. Der dritte Fall zeigte an Tag neun eine mediane Einwanderungstiefe von 1404 μm . In einer Zone von 874 μm bis 2194 μm befanden sich 50 % der CPC. Die weiteste gemessene Zelle wurde in einer Tiefe von 3555 μm gefunden. Die am wenigsten gewanderte Zelle lag 120 μm unter der Oberfläche der Knorpelstanzung.

Die Untersuchungen am vierzehnten Tag der Einwanderungsversuche zeigten, dass die mediane Eindringtiefe im ersten Fall bei 1596 μm lag. Die Hälfte der CPC war in einem Bereich von 1264 μm bis 2018 μm zu finden. In einer Entfernung von 2522 μm von der Knorpeloberfläche konnte die am weitesten gewanderte Zelle nachgewiesen werden, während die minimale Migrationstiefe 657 μm betrug. Bei den Zellen des zweiten Falls ließ sich zu diesem Zeitpunkt ein Einwanderungstiefenmedian von 1881 μm feststellen.

Fünzig Prozent der CPC befanden sich in einer Zone zwischen 1411 μm und 2339 μm . Die minimale Eindringtiefe betrug 235 μm und die tiefste gemessene Zelle lag 2575 μm von der Knorpeloberfläche entfernt. Die CPC des Falls 3 wiesen an Tag 14 eine mediane Wanderungstiefe von 1627 μm und ein Intervall zwischen der 25 %- und 75 %-Perzentile auf, das sich von 1353 μm bis zu 1960 μm Einwanderungstiefe erstreckte. Im Minimum waren die Zellen 458 μm und im Maximum 2411 μm weit in das Knorpelgewebe eingedrungen.

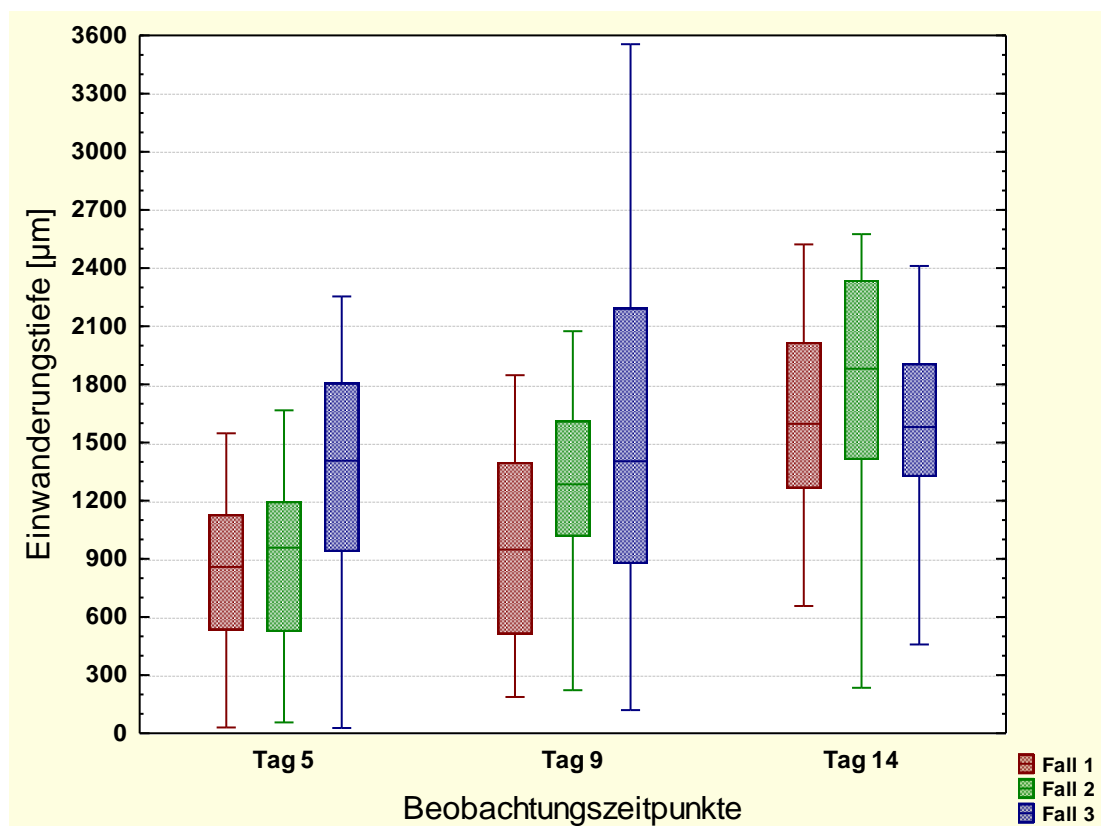


Abbildung 5: Ex-vivo-Einwanderungstiefe der CPC aus Fall 1, 2 und 3 im G-Knorpel. Die Abbildung zeigt den Median der Einwanderungstiefen als Balken. Der Box-Plot erstreckt sich jeweils von der 25 %-Perzentile bis zur 75 %-Perzentile. Der Whisker gibt jeweils die minimale und maximale Einwanderungstiefe an.

3.2.2.b Einwanderungstiefe im R-Knorpel

Die Dauer der Ex-vivo-Migrationsversuche im R-Knorpel betrug wie im G-Knorpel 14 Tage mit Beobachtungszeitpunkten am fünften, neunten und vierzehnten Tag nach Aufbringen der fluoreszenzmarkierten CPC (Fall 1, 2, 3) auf die Oberfläche der Knorpelstanzungen (Fall A, B, C). Zusätzlich wurden weitere Ex-vivo-Migrationsversuche mit Beobachtungszeitpunkten am zweiten und dritten Tag der Migration durchgeführt, um die frühe Phase der Migration näher zu untersuchen (Fall 5, 6, E, F, G, H).

Am fünften Tag des Migrationsversuchs zeigte sich im Fall 1 eine mediane Einwanderungstiefe von 804 μm , wobei die Hälfte der Zellen in einem Intervall von 512 μm bis 1052 μm lagen. Die oberflächlichste Zelle war in einer Tiefe von 125 μm , die tiefste CPC hingegen bei 1316 μm zu finden. Bei den CPC des zweiten Falls war an Tag fünf ein Tiefenmedian von 616 μm zu beobachten. Die 25 %-Perzentile lag bei 441 μm , während sich die 75 %-Perzentile bei 1118 μm befand. Im Minimum wanderten die CPC 29 μm tief in den Knorpel ein und die weiteste Entfernung einer fluoreszierenden Zelle von der Knorpeloberfläche aus wurde mit 1526 μm gemessen. Im dritten Fall befand sich der Tiefenmedian der CPC bei 1176 μm und 50 % der Zellen konnten in einem Bereich zwischen 747 μm und 1484 μm nachgewiesen werden. Die am weitesten gewanderte CPC befand sich 1885 μm von der Knorpeloberfläche entfernt, während die Zelle mit der geringsten Tiefe bei 230 μm lag.

Am neunten Tag des Versuchs im Fall 1 war eine mediane Eindringtiefe von 732 μm zu messen. Die Zellen wanderten mindestens 302 μm und maximal 1344 μm weit in das Knorpelgewebe. Die Hälfte der eingewanderten CPC befand sich in einem Intervall zwischen 649 μm und 1028 μm . Bei den Zellen des zweiten Falls lag zu diesem Zeitpunkt die mediane Migrationstiefe bei 750 μm . Fünfzig Prozent der eingewanderten CPC hielten sich in einem Bereich zwischen 447 μm und 945 μm auf. Die geringste Eindringtiefe lag bei 135 μm , wohingegen die weiteste Entfernung einer CPC zur Knorpeloberfläche 1619 μm betrug. Der Median der Eindringtiefe an Tag 9

bei den Zellen aus Fall 3 betrug 1131 μm . Die Zone, in der sich die Hälfte der eingewanderten Zellen befand, erstreckte sich von 943 μm bis zu 1406 μm . Die geringste zurückgelegte Distanz zur Knorpeloberfläche betrug 148 μm , wobei die am tiefsten gewanderte Zelle bei 1900 μm lag.

Der vierzehnte Tag der Untersuchungen an den Zellen des ersten Falls zeigte eine mediane Entfernung der eingewanderten CPC zur Knorpeloberfläche von 817 μm . Im Minimum waren die Zellen 266 μm und maximal 1787 μm von der Oberfläche aus in das Gewebe eingedrungen. Die 25 %-Perzentile befand sich bei 666 μm , während die 75 %-Perzentile bei 1307 μm lag.

An Tag 14 in Fall 2 waren die oberflächlichste und die tiefste Zelle in einer Distanz von 125 μm bzw. 2238 μm zu beobachten. Die mediane Einwanderungstiefe lag bei 889 μm . Fünfzig Prozent der Zellen befanden sich innerhalb einer Zone von 561 μm bis 1325 μm . Im dritten Fall betrug die mediane Eindringtiefe der CPC zu diesem Messzeitpunkt 963 μm . Die Hälfte der Zellen konnten zwischen 765 μm und 1191 μm nachgewiesen werden, wobei die minimale Invasionstiefe 286 μm und die größte Distanz einer Zelle zur Knorpeloberfläche 1745 μm betragen.

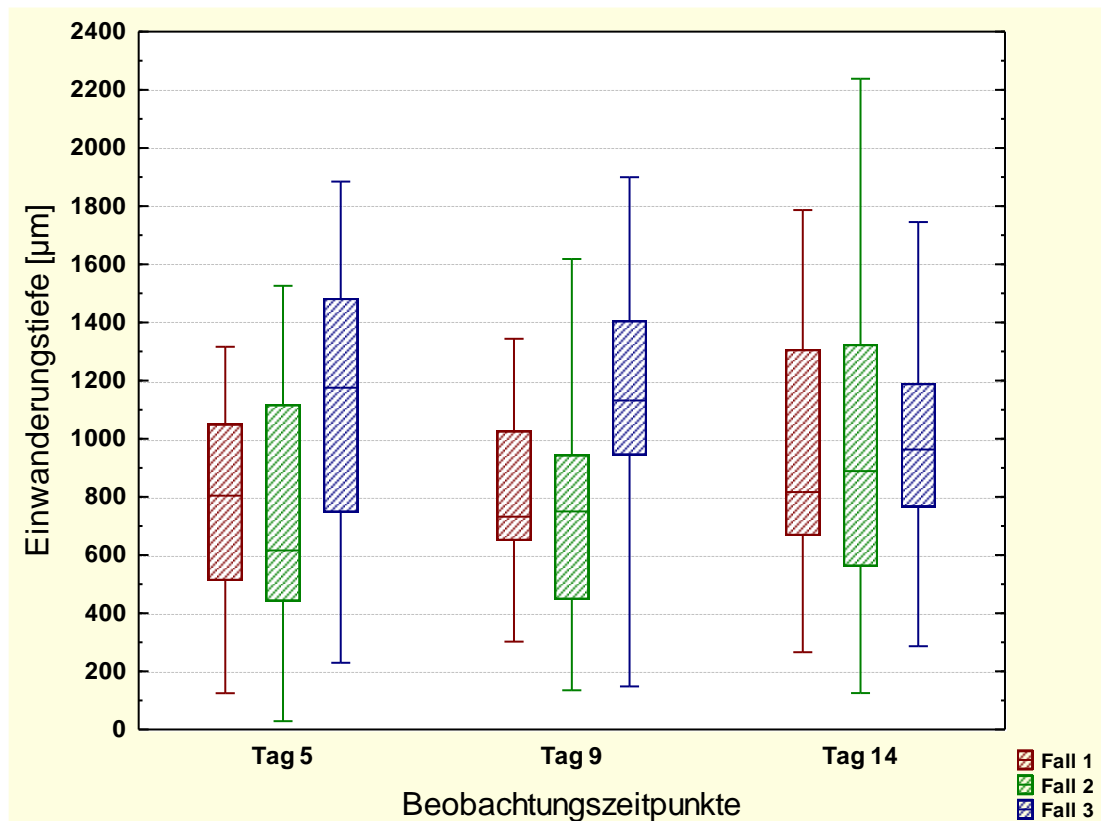


Abbildung 6: Ex-vivo-Einwanderungstiefe der CPC aus Fall 1, 2 und 3 im R-Knorpel nach 5, 9 und 14 Tagen. Die Abbildung zeigt den Median der Einwanderungstiefen als Balken. Der Box-Plot erstreckt sich jeweils von der 25 %-Perzentile bis zur 75 %-Perzentile. Der Whisker gibt jeweils die minimale und maximale Einwanderungstiefe an.

Am zweiten Tag der zusätzlichen Migrationversuche ließ sich bei den Zellen aus Fall 5 eine mediane Einwanderungstiefe von 1534 μm feststellen. Fünfzig Prozent der eingedrungenen CPC waren in einem Bereich zu finden, der von 866 μm bis zu 2027 μm reichte. Die minimale gemessene Strecke, die eine CPC zurückgelegt hatte, betrug 307 μm , während die weiteste Entfernung von der Knorpeloberfläche 2616 μm maß.

Im sechsten Fall konnte an Tag 2 der Ex-vivo-Migrationsversuche ein Tiefenmedian von 1481 μm gemessen werden, wobei die 25 %- und 75 %-Perzentilen bei 1107 μm bzw. 1795 μm lagen. Die minimale bzw. maximale Eindringtiefe der CPC in das Gewebe waren 606 μm und 2333 μm .

An Tag 3 der zusätzlichen Migrationsversuche lag die mediane Eindringtiefe der Zellen aus Fall 5 bei 1287 μm , wobei die minimal zurückgelegte Ein-

wanderungsstrecke 715 μm und die maximal zurückgelegte Strecke 1832 μm betragen. Die Hälfte der CPC befand sich zwischen 1112 μm und 1462 μm . Der Median der Migrationstiefe der CPC aus Fall 6 lag am dritten Tag bei 1266 μm . Fünfzig Prozent dieser Zellen konnten in einem Bereich zwischen 947 μm und 1460 μm gefunden werden. Die oberflächlichste CPC befand sich bei 595 μm und die tiefste eingewanderte Zelle lag 2085 μm von der Knorpeloberfläche entfernt.

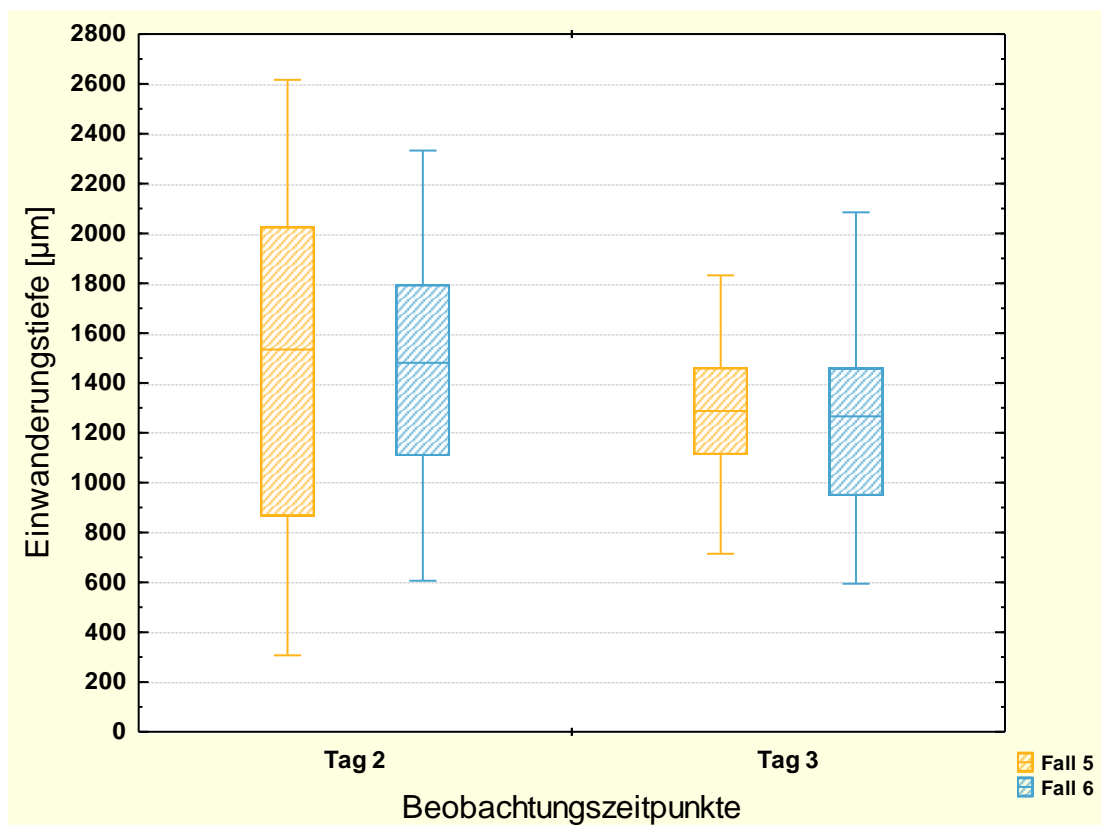


Abbildung 7: Ex-vivo-Einwanderungstiefe der CPC aus Fall 5 und 6 im R-Knorpel nach 2 und 3 Tagen. Die Abbildung zeigt den Median der Einwanderungstiefen als Balken. Der Box-Plot erstreckt sich jeweils von der 25 %-Perzentile bis zur 75 %-Perzentile. Der Whisker gibt jeweils die minimale und maximale Einwanderungstiefe an.

Die Abbildung 8 zeigt noch einmal exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Einwanderungstiefe der CPC im R-Knorpel nach neun Tagen Ex-vivo-Migration.

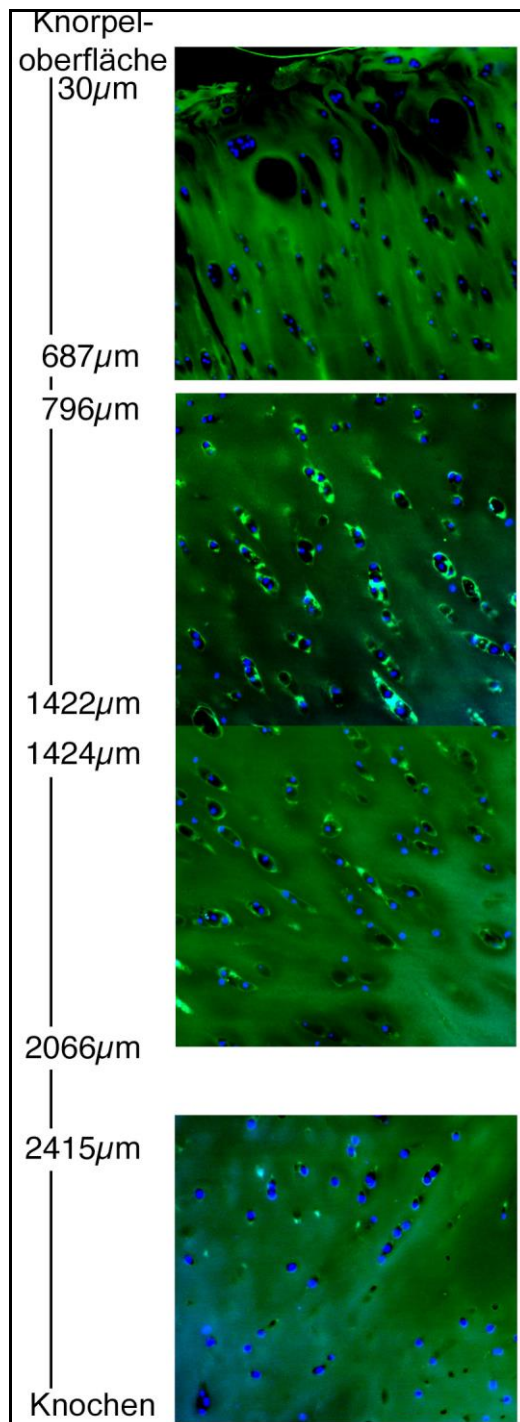


Abbildung 8: Einwanderungstiefe der CPC aus Fall 3 im R-Knorpel an Tag 9 der Ex-vivo-Migrationsversuche. Die Aufnahmen zeigen exemplarisch einen der untersuchten Gewebeschnitte von der Knorpeloberfläche bis zum Übergang in den Knochen. Es ist die zerklüftete Oberfläche des R-Knorpels zu erkennen. Die Zellkerne fluoreszieren durch die Anlagerung von DAPI an die DNA blau. Eingewanderte CPC sind an der grünen Fluoreszenz (maxGFP) zu erkennen. Der Hauptteil der eingewanderten CPC befindet sich in einer Tiefe zwischen 800 µm und 1500 µm. Einige CPC waren in dieser Zeit schon in eine Tiefe von etwa 2420 µm vorgedrungen.

Aus: KOELLING et al. 2009.

3.2.2.c Verteilungsmuster im Gewebe

Die fluoreszenzmarkierten CPC wanderten sowohl in den G-Knorpel als auch in den R-Knorpel ein. Es war jedoch auffallend, dass sich die eingewanderten CPC in den verschiedenen Knorpelproben unterschiedlich ausbreiteten. So war im G-Knorpel ein eher homogenes Verteilungsmuster der CPC zu beobachten. Die eingewanderten Zellen lagen meist in kleinen Grüppchen (2 bis ca. 5 Zellen) oder einzeln im Gewebe.

Im Gegensatz hierzu ließ sich im R-Knorpel ein anderes Verteilungsmuster erkennen. Die CPC lagen hier zwar auch einzeln und in kleinen Grüppchen vor, jedoch ließen sich häufig große Zellverbunde (Cluster) mit teilweise über 25 Zellen in unterschiedlichen Tiefen der untersuchten Gewebeschnitte beobachten. Es schien als ob sich diese Zellverbunde zum Teil entlang von präformierten Defekten des Knorpelgewebes in die Tiefe bewegten.

Mit zunehmender Entfernung von der Knorpeloberfläche und je intakter das Knorpelgewebe wirkte, desto mehr ähnelte die Verteilung der eingewanderten CPC im R-Knorpel dem Verteilungsmuster im G-Knorpel.

Die Abbildung 9 auf der folgenden Seite zeigt diese Beobachtungen.

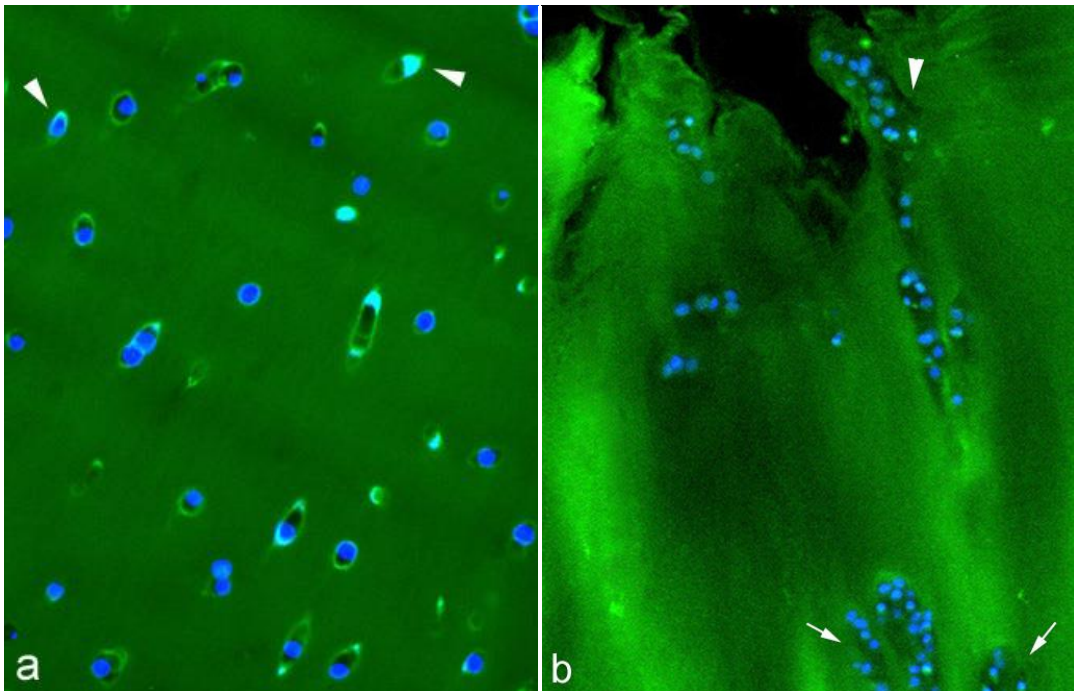


Abbildung 9: Verteilungsmuster der CPC im Knorpelgewebe *ex vivo*. a) G-Knorpel mit CPC aus Fall 1 an Tag 9 der Ex-vivo-Migration. Es sind mehrere Zellen im Gewebe abgebildet. Die Zellkerne fluoreszieren durch die Anlagerung von DAPI an die DNA blau. Einige der Zellen sind aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz (maxGFP) als eingewanderte CPC zu erkennen. Zwei sind exemplarisch mit Pfeilspitzen markiert. b) R-Knorpel mit CPC aus Fall 2 an Tag 5 der Ex-vivo-Migration. Die Zellkerne fluoreszieren blau (DAPI). Am oberen Bildrand ist die Knorpeloberfläche mit den für R-Knorpel typischen Fissuren zu erkennen. Die Pfeilspitze zeigt auf eine dieser Fissuren, entlang derer mehrere Zellen in den Knorpel einwandern. Einige dieser Zellen sind positiv für maxGFP. Dies zeigt, dass es sich um CPC handelt. Im weiteren Verlauf sind zwei große Zellcluster (Pfeile) dargestellt, die sowohl aus maxGFP positiven als auch aus Zellen ohne grüne Fluoreszenz bestehen.

3.3 Proliferationsfähigkeit ex vivo

Die eingewanderten CPC wurden während der Ex-vivo-Migrationsversuche auf ihre Vitalität im Gewebe untersucht. Dies erfolgte ebenfalls zu den Zeitpunkten (Tag 5, Tag 9, Tag 14) der Tiefenmessung der Ex-vivo-Migrationsversuche. Hierzu wurden die Zellen immunfluoreszenzhistochemisch auf das Vorkommen des Ki-67-Proteins, das als Marker der Proliferationsfähigkeit gilt, hin überprüft. Durch die Transfektion mit maxGFP

konnten eingewanderte CPC von den ortsständigen Zellen unterschieden werden. Als proliferationsfähige, eingewanderte CPC wurden folglich nur solche Zellen bewertet, die sowohl eine grüne Eigenfluoreszenz besaßen als auch für Ki-67 positiv (rote Fluoreszenz) waren. Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch einige Zellen, die diese Kriterien erfüllen.

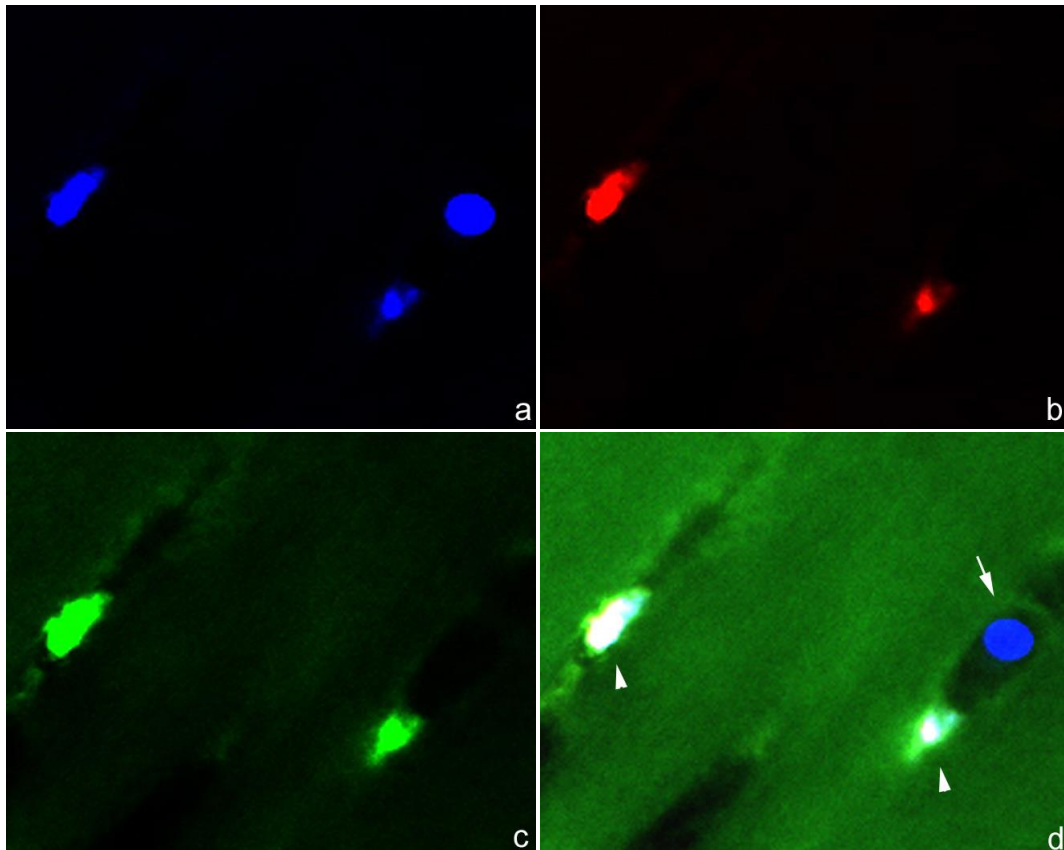


Abbildung 10: Ki-67- und maxGFP-positive CPC im Knorpel. a) Es sind drei Zellen zu erkennen, deren Kerne nach der Bindung von DAPI an die DNA blau fluoreszieren. b) An zwei dieser Zellen ist ein rotes Fluoreszenzsignal zu beobachten, das sich auf den Zellkern beschränkt und den dort gebundenen Ki-67-Antikörper nachweist. Die dritte Zelle weist kein Signal auf. c) Die beiden Ki-67-positiven Zellen zeigen deutliche grüne Eigenfluoreszenz (maxGFP), die sich über den Bereich der Zellkerne und des Ki-67-Signals hinaus erstreckt. Die dritte Zelle weist erneut kein Signal auf. d) Es ist die Überlagerung der Aufnahmen a bis c zu sehen. Die Pfeilspitzen markieren die für maxGFP und Ki-67 positiven CPC. Die Überlagerung der drei Fluoreszenzsignale führt an dieser Stelle zu einer weißlich-gelben Färbung. Es ist zu erkennen, dass sich die Bereiche der Fluoreszenz von maxGFP und Ki-67 deutlich voneinander unterscheiden. Der Pfeil markiert eine Zelle, die sowohl für maxGFP als auch für Ki-67 negativ ist.

3.3.1 Dauer der Proliferationsfähigkeit im G-Knorpel

Bei den immunfluoreszenzhistochemischen Untersuchungen der Zellen im G-Knorpel waren nach fünf, neun und vierzehn Tagen der Ex-vivo-Migrationsversuche jeweils Ki-67-positive CPC zu beobachten. Außerdem konnten auch einige Zellen aufgefunden werden, die für Ki-67 positiv waren, während sie keine grüne Eigenfluoreszenz aufwiesen (siehe Abbildung 11).

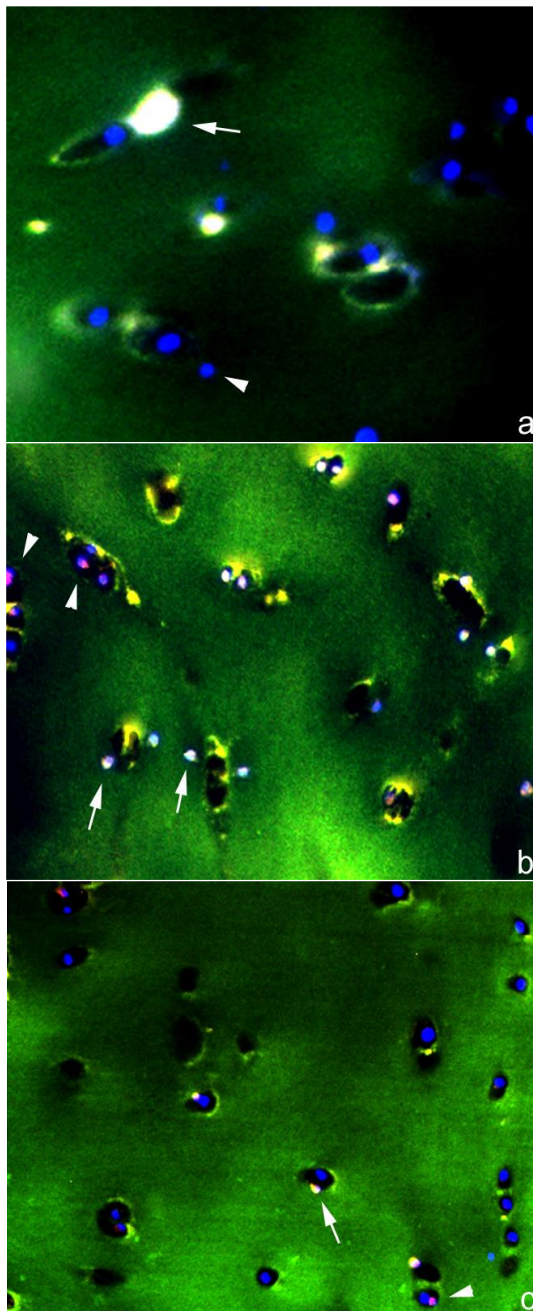


Abbildung 11: Ki-67-positive CPC im G-Knorpel an Tag 5, Tag 9 und Tag 14.

a) G-Knorpel mit Zellen aus Fall 2 an Tag fünf der Ex-vivo-Migrationsversuche. Exemplarisch ist eine für Ki-67 und maxGFP positive CPC mit einem Pfeil markiert. Die Pfeilspitze zeigt eine sowohl Ki-67- als auch maxGFP-negative Zelle.

b) G-Knorpel mit CPC aus Fall 3 an Tag 9 der Ex-vivo-Migrationsversuche. Es sind mehrere Ki-67-positive CPC zu erkennen (zwei sind mit Pfeilen markiert). Die Aufnahme zeigt auch Zellen, die nur für Ki-67 positiv sind (Pfeilspitzen).

c) G-Knorpel mit Zellen aus Fall 2 an Tag 14 der Ex-vivo-Migrationsversuche. Es sind mehrer Zellkerne (blau) zu erkennen. Der Pfeil deutet auf eine der Ki-67-positiven CPC. Mit der Pfeilspitze ist eine nur für Ki-67 positive Zelle markiert.

Dennoch zeigten sich interindividuelle Unterschiede in der Dauer der Proliferationsfähigkeit zwischen den Zellen der einzelnen CPC-Populationen. So waren bei den CPC aus Fall 1 im Gegensatz zu denen aus Fall 2 und Fall 3 am vierzehnten Tag keine Ki-67 positiven CPC in den untersuchten Proben nachzuweisen. Die Auswertung der untersuchten Proben offenbarte aber auch intraindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Während die Anzahl an positiven CPC an den ersten beiden Zeitpunkten vergleichbar war, nahm sie zum vierzehnten Tag hin merkbar ab.

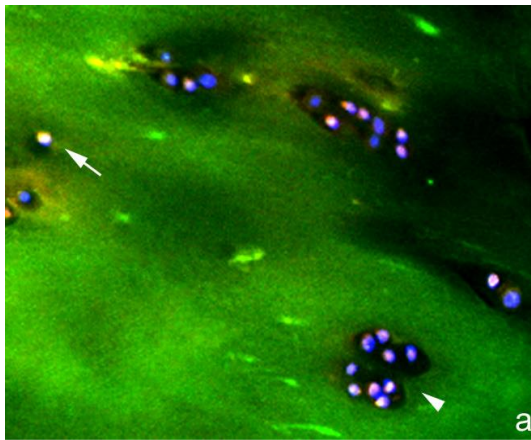
3.3.2 Dauer der Proliferationsfähigkeit im R-Knorpel

Die immunofluoreszenzhistochemischen Untersuchungen der CPC im R-Knorpel ergaben ebenfalls Ki-67-positive CPC bis zum vierzehnten Tag der Ex-vivo-Migrationsversuche. Es konnten, ebenso wie im G-Knorpel, auch einige für maxGFP negative und für Ki-67 positive Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12).

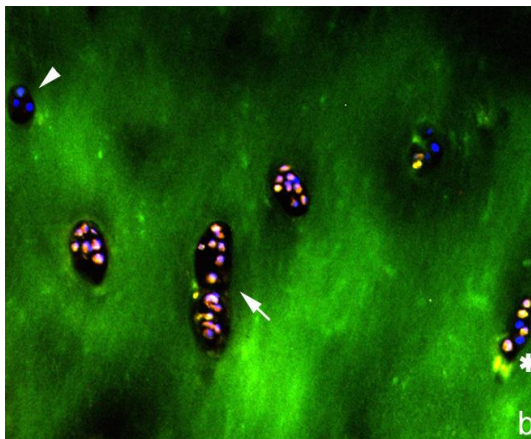
Die interindividuellen Unterschiede in der Dauer der Proliferationsfähigkeit der CPC zeigten sich ebenfalls im R-Knorpel. So wurden an den CPC aus den Fällen 2 und 3 jeweils zu jedem Beobachtungszeitpunkt für Ki-67 positive CPC nachgewiesen. Während an den Zellen aus Fall 1 an Tag 5 und Tag 9 proliferationsfähige CPC beobachtet werden konnten, dies allerdings am vierzehnten Tag in den untersuchten Proben nicht mehr gelang. Im Gegensatz zum G-Knorpel waren die CPC im R-Knorpel häufiger in Clustern angeordnet.

Die gefundenen Beobachtungen sind exemplarisch in der Abbildung 12 auf der folgenden Seite dargestellt.

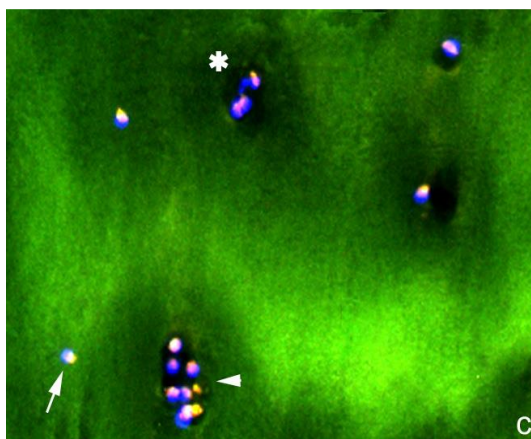
Abbildung 12: Ki-67-positive CPC im R-Knorpel an Tag 5, Tag 9 und Tag 14.



a) R-Knorpel mit CPC aus Fall 2 an Tag 5 der Ex-vivo-Migrationsversuche. Es sind drei Zellcluster mit sowohl Ki-67-positiven CPC als auch für maxGFP und Ki-67 negativen Zellen zu erkennen. Die Pfeilspitze zeigt auf eines dieser Cluster. Der Pfeil markiert eine Ki-67-positive CPC, die einzeln im Gewebe liegt.



b) Die Aufnahme zeigt R-Knorpel an Tag 9 mit CPC aus Fall 2. Es sind mehrere Zellcluster zu erkennen. Der Pfeil weist auf einen Cluster aus Ki-67-positiven CPC und Zellen. Die Pfeilspitze markiert einen Zellcluster, dessen Zellen weder eine Antikörperbindung noch eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Der mit einem Stern gekennzeichnete Cluster besteht sowohl aus Ki-67- und maxGFP-positiven CPC als auch aus hierfür negativen Zellen.



c) R-Knorpel mit CPC aus Fall 2 an Tag 14. Die Pfeilspitze markiert einen Zellcluster aus Ki-67-positiven Zellen, von denen einige auch maxGFP exprimieren. Der Pfeil zeigt auf eine einzeln in der Knorpelmatrix gelegene proliferationsfähige CPC. Der Stern markiert Zellen mit einer deutlichen roten Fluoreszenz, wobei nur die obere auch für maxGFP positiv ist.

3.4 Genexpressionsmuster

3.4.1 Differenzierungsrichtung in P0

Die Differenzierungsrichtung der CPC in P0 wurde anhand der Expression ausgewählter Gene in P0 untersucht. Hierbei dienten Kollagen Typ I, MMP 13, ADAMTS 5 und Runx 2 als Indikatoren einer fibroblastischen Differenzierung und Kollagen Typ II, Aggrecan und Sox 9 als Marker für eine chondrogene Entwicklungsrichtung. Um eine Aussage über die Entwicklungsrichtung der CPC in P0 treffen zu können, wurden die durchschnittlichen relativen Expressionsunterschiede der Markergene unter Verwendung der REST 2009 Software berechnet (siehe Kapitel 2.6.4.d). Dafür wurden Kollagen I und Kollagen II gegenübergestellt sowie die chondrogenen Proteine Aggrecan und Kollagen II mit den entsprechenden, sie abbauenden Enzymen ADAMTS 5 und MMP 13 verglichen. Außerdem wurde der Unterschied zwischen dem chondrogenen Entwicklungsmarker Sox 9 und dem osteoblastischen Entwicklungsmarker Runx 2 untersucht.

Bei den Untersuchungen fiel auf, dass Kollagen I in allen vier CPC-Populationen deutlich stärker - in drei von vier Fällen mit einer Steigerung von über 800 % - exprimiert wurde als Kollagen II. Im Vergleich der chondrogenen Proteine mit den diese Proteine abbauenden Enzymen zeigte sich, dass die Expression von Aggrecan in allen untersuchten Proben über der von ADAMTS 5 lag. In drei Fällen lag die Menge an Aggrecan-mRNA über dem Vierfachen der Menge von ADAMTS 5. Der Vergleich zwischen Kollagen II und MMP 13 ergab nur bei den CPC aus Fall 2 einen statistisch signifikanten Unterschied, indem Kollagen II in diesem Fall durchschnittlich um 912 % erhöht war. In den übrigen drei Fällen schien Kollagen II zwar leicht vermehrt, diese Beobachtung war allerdings ohne statistische Signifikanz. Die Expression des chondrogenen Markers Sox 9 war in drei CPC-Populationen im Vergleich zu Runx 2 vermehrt, wobei durchschnittlich Werte zwischen dem 1,5fachen und dem 3,3fachen vorlagen. Im vierten Fall

war Sox 9 im Vergleich zu Runx 2 um 32 % vermindert. Eine Übersicht der Ergebnisse liefert Tabelle 14.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
Fall 1	Kollagen I / Kollagen II	871,08	437,36 - 2048,00	274,37 - 2.702,35	0,000	UP
	Aggrecan / ADAMTS 5	1,50	0,93 - 2,00	0,87 - 2,46	0,001	UP
	Kollagen II / MMP 13	1,53	0,49 - 4,08	0,38 - 7,46	0,162	
	Sox 9 / Runx 2	0,68	0,37 - 1,02	0,27 - 1,52	0,030	DOWN
Fall 2	Kollagen I / Kollagen II	73,52	53,70 - 111,43	25,99 - 168,90	0,000	UP
	Aggrecan / ADAMTS 5	5,24	4,60 - 6,50	3,48 - 7,46	0,000	UP
	Kollagen II / MMP 13	9,12	4,93 - 16,00	3,73 - 21,11	0,000	UP
	Sox 9 / Runx 2	3,30	2,64 - 4,29	2,14 - 4,60	0,000	UP
Fall 3	Kollagen I / Kollagen II	825,37	415,87 - 2089,16	337,79 - 3.326,99	0,000	UP
	Aggrecan / ADAMTS 5	4,00	3,25 - 4,93	2,14 - 5,66	0,000	UP
	Kollagen II / MMP 13	1,61	0,62 - 4,00	0,33 - 5,28	0,109	
	Sox 9 / Runx 2	2,32	1,52 - 3,25	0,87 - 8,00	0,000	UP
Fall 4	Kollagen I / Kollagen II	819,03	512,00 - 1351,18	222,86 - 2.048,00	0,000	UP
	Aggrecan / ADAMTS 5	5,57	3,03 - 11,79	1,87 - 21,11	0,000	UP
	Kollagen II / MMP 13	1,41	0,50 - 5,66	0,35 - 8,57	0,339	
	Sox 9 / Runx 2	1,49	1,07 - 2,14	0,71 - 3,25	0,018	UP

Tabelle 14: Relative Quantifizierung der Expression ausgewählter Gene mittels REST 2009 Software in den CPC-Populationen aus den Fällen 1 bis 4 in P0. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

3.4.2 Einfluss der Passagen auf die Genexpression

Der Einfluss der Kultivierung *in vitro* auf die Zellen wurde untersucht, indem das Genexpressionsmuster der jeweiligen CPC während der Passagen auf Veränderungen hin überprüft wurde. Als Referenz galt die Expression der Markergene zum Beginn der Zellkultur (P0). Eine mögliche Veränderung der Expression wurde als relativer Unterschied (Ratio) unter Verwendung der REST 2009 Software (siehe Kapitel 2.6.4.d) berechnet.

Für die CPC-Population aus Fall 1 ließen sich folgende Beobachtungen feststellen. Die Expression von Kollagen I war in P1 und P2 gegenüber P0 auf ca. 60 % verringert, stieg aber in P3 über den Ausgangswert an. Die Expressionen von Kollagen II und MMP 13 zeigten keine signifikanten Veränderungen über die Beobachtungsdauer. Im Fall von Aggrecan war die Genexpression während der ersten zwei Passagen ebenfalls unverändert, in P3 zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg auf den 2,9fachen Ausgangswert. Die Menge an mRNA von ADAMTS 5 zeigte sich über die gesamte Beobachtungsdauer gleichbleibend vermindert. Im Fall von Sox 9 nahm die Expression von P1 zu P3 stetig ab. Bei der Genexpression von Runx 2 war in P1 ein Rückgang auf 62 % zu verzeichnen, der im weiteren Verlauf rückläufig war, so dass in P3 kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsniveau mehr erkennbar war.

Eine genaue Übersicht über die ermittelten Werte gibt Tabelle 15.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
P1 / P0	Kollagen I	0,59	0,44 - 0,77	0,33 - 1,00	0,001	DOWN
	Kollagen II	0,93	0,25 - 3,38	0,12 - 4,93	0,810	
	MMP 13	0,97	0,34 - 2,83	0,19 - 4,29	0,916	
	Aggrecan	0,92	0,65 - 1,41	0,44 - 1,87	0,553	
	ADAMTS 5	0,69	0,57 - 0,87	0,35 - 0,93	0,000	DOWN
	Sox 9	0,63	0,41 - 1,15	0,35 - 1,41	0,016	DOWN
	Runx 2	0,62	0,47 - 0,81	0,23 - 1,07	0,000	DOWN
P2 / P0	Kollagen I	0,54	0,44 - 0,66	0,35 - 0,76	0,000	DOWN
	Kollagen II	0,73	0,29 - 2,30	0,15 - 3,03	0,310	
	MMP 13	0,52	0,10 - 2,23	0,04 - 3,25	0,198	
	Aggrecan	1,26	0,93 - 2,00	0,47 - 2,30	0,121	
	ADAMTS 5	0,66	0,57 - 0,76	0,54 - 0,76	0,001	DOWN
	Sox 9	0,48	0,33 - 0,87	0,27 - 1,07	0,001	DOWN
	Runx 2	0,74	0,57 - 0,93	0,50 - 1,32	0,004	DOWN
P3 / P0	Kollagen I	1,45	1,07 - 1,87	0,87 - 2,30	0,004	UP
	Kollagen II	1,07	0,30 - 4,00	0,14 - 5,28	0,832	
	MMP 13	1,04	0,38 - 2,69	0,29 - 4,93	0,857	
	Aggrecan	2,90	2,14 - 4,08	1,74 - 5,28	0,000	UP
	ADAMTS 5	0,86	0,76 - 0,95	0,66 - 1,00	0,005	DOWN
	Sox 9	0,44	0,27 - 0,81	0,22 - 1,07	0,001	DOWN
	Runx 2	0,94	0,76 - 1,15	0,66 - 1,52	0,485	

Tabelle 15: Relative Quantifizierung der Genexpression mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 1. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Die Untersuchungen der CPC-Population des zweiten Falls zeigten bis in Passage 3 bei den fibroblastischen Markergenen einen deutlichen Anstieg der Expression von Kollagen I bis auf das 4,3fache und von Runx 2 bis auf das 9,5fache des Ausgangswerts, wohingegen der Gehalt von MMP 13

unverändert blieb. Die Expression der chondrogenen Markergene lag in allen Passagen gleichbleibend unter dem Niveau aus P0. Hierbei war Kollagen II mit einem Rückgang von über 80 % am deutlichsten vermindert. Die Expression von Aggrecan, ADAMTS 5 und Sox 9 war auf ca. die Hälfte der Ausgangswerte reduziert. Die genauen Werte hierzu sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
P1 / P0	Kollagen I	2,28	1,39 - 3,25	1,00 - 7,46	0,000	UP
	Kollagen II	0,22	0,10 - 0,41	0,07 - 0,50	0,000	DOWN
	MMP 13	1,11	0,60 - 2,46	0,29 - 3,49	0,659	
	Aggrecan	0,54	0,40 - 0,71	0,33 - 1,07	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,52	0,47 - 0,62	0,41 - 0,66	0,000	DOWN
	Sox 9	0,47	0,35 - 0,62	0,29 - 0,76	0,000	DOWN
	Runx 2	2,10	1,63 - 2,64	1,23 - 3,25	0,000	UP
P2 / P0	Kollagen I	2,58	1,52 - 3,73	1,00 - 9,19	0,000	UP
	Kollagen II	0,12	0,06 - 0,19	0,04 - 0,25	0,000	DOWN
	MMP 13	0,63	0,28 - 1,41	0,14 - 2,46	0,095	
	Aggrecan	0,73	0,57 - 0,93	0,47 - 1,32	0,005	DOWN
	ADAMTS 5	0,44	0,38 - 0,50	0,33 - 0,57	0,000	DOWN
	Sox 9	0,67	0,47 - 0,93	0,33 - 2,30	0,028	DOWN
	Runx 2	5,16	4,29 - 6,19	3,25 - 7,46	0,000	UP
P3 / P0	Kollagen I	4,32	2,98 - 5,66	1,87 - 13,00	0,000	UP
	Kollagen II	0,14	0,05 - 0,27	0,04 - 0,33	0,000	DOWN
	MMP 13	0,75	0,38 - 1,51	0,23 - 2,46	0,222	
	Aggrecan	0,51	0,40 - 0,66	0,23 - 0,93	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,46	0,41 - 0,50	0,35 - 0,57	0,000	DOWN
	Sox 9	0,47	0,29 - 1,07	0,01 - 1,23	0,032	DOWN
	Runx 2	9,33	8,00 - 11,31	6,50 - 12,13	0,000	UP

Tabelle 16: Relative Quantifizierung der Genexpression mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 2. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten

Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Die CPC-Population aus Fall 3 ließ unter der Kultivierung *in vitro* folgende Veränderungen der Genexpression erkennen. Die Menge an Kollagen Typ I - mRNA unterlag deutlichen Schwankungen. So war sie in Passage 1 im Mittel auf 36 % des Ausgangswertes gesunken und lag in P3 noch bei 57 %, wobei in Passage 2 keine signifikante Veränderung zu P0 nachzuweisen war. Auch im Fall von Kollagen II gab es keinen einheitlichen Trend. In P1 kam es noch zu keiner Veränderung. In P2 war die Genexpression auf das 2,6fache angestiegen und lag dann in Passage 3 wieder deutlich unter dem Ausgangsniveau. Die Expression von MMP 13 war über die gesamte Zeit unverändert. Die Menge an Abschriften des Aggrecangens war bis in P3 erhöht, mit einem Maximum in Passage 1. Die Expression von ADAMTS 5, dem Gegenspieler von Aggrecan, stieg über die ersten beiden Beobachtungszeitpunkte ebenfalls an, um in P3 aber wieder unter dem Level aus P0 zu liegen. Der chondrogene Entwicklungsfaktor Sox 9 war in P1 stark erhöht, ab P2 dann wieder konstant auf dem Ausgangsniveau, wohingegen Runx 2 über die gesamte Zeit bei ungefähr der Hälfte der Expression aus P0 lag.

Eine Übersicht über die genauen Werte zeigt die Tabelle 17 auf der folgenden Seite.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
P1 / P0	Kollagen I	0,36	0,25 - 0,62	0,06 - 1,07	0,000	DOWN
	Kollagen II	1,09	0,56 - 3,09	0,18 - 5,66	0,797	
	MMP 13	0,99	0,54 - 2,14	0,15 - 2,64	0,928	
	Aggrecan	2,62	2,14 - 3,25	1,52 - 4,93	0,000	UP
	ADAMTS 5	1,66	1,41 - 2,00	1,23 - 2,30	0,000	UP
	Sox 9	6,86	4,21 - 16,00	0,13 - 32,00	0,002	UP
	Runx 2	0,41	0,31 - 0,57	0,20 - 0,71	0,000	DOWN
P2 / P0	Kollagen I	0,88	0,65 - 1,23	0,47 - 1,52	0,280	
	Kollagen II	2,60	0,69 - 6,50	0,41 - 22,63	0,026	UP
	MMP 13	1,39	0,69 - 2,83	0,54 - 3,73	0,122	
	Aggrecan	1,94	1,00 - 3,25	0,76 - 5,28	0,003	UP
	ADAMTS 5	2,05	1,63 - 2,46	1,41 - 2,83	0,000	UP
	Sox 9	1,00	0,81 - 1,32	0,31 - 2,46	0,983	
	Runx 2	0,52	0,38 - 0,72	0,29 - 0,93	0,000	DOWN
P3 / P0	Kollagen I	0,57	0,35 - 0,87	0,25 - 1,23	0,000	DOWN
	Kollagen II	0,31	0,10 - 0,89	0,07 - 1,87	0,003	DOWN
	MMP 13	1,25	0,53 - 2,83	0,31 - 4,29	0,422	
	Aggrecan	1,69	1,15 - 2,30	0,81 - 3,48	0,002	UP
	ADAMTS 5	0,74	0,60 - 0,89	0,54 - 1,07	0,001	DOWN
	Sox 9	1,29	0,76 - 2,19	0,31 - 4,29	0,252	
	Runx 2	0,50	0,35 - 0,71	0,25 - 1,00	0,001	DOWN

Tabelle 17: Relative Quantifizierung der Genexpression mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 3. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Die molekularbiologische Untersuchung der Zellen aus Fall 4 zeigte für alle Markergene keinen signifikanten Expressionsunterschied in Passage 1. Die Menge an Kollagen I war in P1 statistisch nicht signifikant verändert und zeigte dann eine signifikante Reduktion bis auf 35 % des Ausgangswertes in P3. Die Testungen auf Kollagen II und Aggrecan zeigten erst in Passage 3 statistisch signifikante Veränderungen des Expressionsniveaus auf ca. die Hälfte. Die Menge von MMP 13 und Sox 9 blieb in allen Passagen ohne signifikante Veränderungen. Die Menge von ADAMTS 5 war in P1 und P3 im Vergleich zu P0 nicht signifikant verändert, in Passage 2 war sie erhöht, wobei eine relativ große Standardabweichung zu beachten bleibt. Im Fall von Runx 2 zeigten die Untersuchungen keine signifikante Veränderung der Genexpression in Passage 1 und Passage 2. In P3 lag die Menge an Runx 2 dann unterhalb des Levels aus Passage 0.

Die Tabelle 18 auf der folgenden Seite gibt eine Übersicht der einzelnen Ergebnisse der Untersuchungen an der CPC-Population aus Fall 4.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
P1 / P0	Kollagen I	0,57	0,23 - 0,95	0,10 - 2,30	0,058	
	Kollagen II	0,72	0,26 - 1,52	0,13 - 2,83	0,271	
	MMP 13	0,94	0,17 - 6,19	0,04 - 13,00	0,896	
	Aggrecan	0,79	0,54 - 1,17	0,47 - 1,74	0,082	
	ADAMTS 5	1,48	0,36 - 4,17	0,12 - 9,19	0,345	
	Sox 9	0,82	0,56 - 1,32	0,41 - 1,52	0,146	
	Runx 2	0,91	0,62 - 1,17	0,54 - 1,63	0,344	
P2 / P0	Kollagen I	0,55	0,27 - 0,93	0,17 - 2,30	0,017	DOWN
	Kollagen II	0,71	0,23 - 2,03	0,13 - 4,00	0,337	
	MMP 13	0,84	0,12 - 5,38	0,06 - 11,31	0,711	
	Aggrecan	0,97	0,69 - 1,52	0,50 - 2,14	0,827	
	ADAMTS 5	1,80	0,81 - 3,31	0,47 - 8,00	0,043	UP
	Sox 9	0,71	0,44 - 1,17	0,22 - 1,52	0,062	
	Runx 2	0,81	0,54 - 1,23	0,44 - 1,41	0,094	
P3 / P0	Kollagen I	0,34	0,16 - 0,55	0,11 - 1,41	0,000	DOWN
	Kollagen II	0,55	0,23 - 1,09	0,19 - 1,74	0,023	DOWN
	MMP 13	1,06	0,22 - 5,77	0,12 - 13,00	0,932	
	Aggrecan	0,58	0,40 - 0,93	0,29 - 1,32	0,003	DOWN
	ADAMTS 5	0,78	0,47 - 1,63	0,35 - 2,64	0,233	
	Sox 9	0,88	0,57 - 1,35	0,35 - 1,87	0,452	
	Runx 2	0,72	0,53 - 1,02	0,38 - 1,32	0,022	DOWN

Tabelle 18: Relative Quantifizierung der Genexpression mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 4. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

3.4.3 Einfluss der Transfektion auf die Genexpression

Um einen möglichen Einfluss der Transfektion auf das Genexpressionsmuster der CPC zu untersuchen, wurde die Expression der ausgesuchten Markergene in den transfizierten Zellen mit der Expression dieser Gene in nicht transfizierten Zellen der gleichen Passage verglichen. Zudem wurde geprüft, ob sich mögliche Veränderungen des Genexpressionsmusters während der weiteren Kultivierung *in vitro* wieder zurückbildeten oder bestehen blieben. Eine mögliche Veränderung der Expression wurde als relativer Unterschied (Ratio) unter Verwendung der REST 2009 Software (siehe Kapitel 2.6.4.d) berechnet.

Die Messungen in der Zellpopulation aus Fall 1 zeigten, dass die Expression von Kollagen I nach der Transfektion im Vergleich zur Referenzgruppe deutlich vermindert war und auch vermindert blieb. Die Menge von Kollagen II war direkt nach der Transfektion leicht erhöht, sank mit der weiteren Kultivierung wieder ab und war in P3 ohne signifikante Veränderung zu dem Level der Vergleichszellen. Die Expression von MMP 13 wurde durch die Transfektion kaum beeinflusst. Aggrecan und ADAMTS 5 wurden nach der Behandlung deutlich vermindert exprimiert, wobei Aggrecan signifikant reduziert blieb und ADAMTS 5 in P3 keine signifikante Reduktion zum Niveau der Referenzpopulation mehr zeigte. Der Entwicklungsmarker Sox 9 war nach der Transfektion leicht erhöht und stieg in P3 bis auf das ca. 2,5fache weiter an, wohingegen sich Runx 2 deutlich verringert zeigte.

Eine Übersicht gibt Tabelle 19 auf der folgenden Seite.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
GFP P2 / P2	Kollagen I	0,63	0,40 - 0,93	0,22 - 1,32	0,006	DOWN
	Kollagen II	1,65	0,87 - 3,55	0,66 - 5,28	0,026	UP
	MMP 13	1,36	0,29 - 8,16	0,13 - 29,86	0,556	
	Aggrecan	0,06	0,05 - 0,07	0,04 - 0,13	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,20	0,18 - 0,22	0,17 - 0,23	0,000	DOWN
	Sox 9	1,19	1,00 - 1,44	0,87 - 1,74	0,015	UP
	Runx 2	0,17	0,13 - 0,23	0,10 - 0,29	0,000	DOWN
GFP P3 / P3	Kollagen I	0,20	0,15 - 0,27	0,13 - 0,35	0,000	DOWN
	Kollagen II	1,35	0,54 - 4,60	0,38 - 6,50	0,349	
	MMP 13	0,93	0,41 - 2,19	0,23 - 3,48	0,746	
	Aggrecan	0,33	0,27 - 0,41	0,18 - 0,54	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,76	0,38 - 1,17	0,27 - 1,32	0,193	
	Sox 9	2,48	1,83 - 3,48	1,32 - 4,29	0,000	UP
	Runx 2	0,45	0,23 - 0,71	0,17 - 0,87	0,000	DOWN

Tabelle 19: Relative Quantifizierung der Genexpression zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 1. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Bei der CPC-Population von Fall 2 ließen sich im Vergleich von transfizierten und nicht transfizierten CPC einer Passage folgende Beobachtungen feststellen. Es konnte posttransfunktional eine deutliche Abnahme an Kollagen Typ I beobachtet werden, die fortbestand. Die Transfektion veränderte die Expression von Kollagen II und MMP 13 im Vergleich zu der Referenzgruppe statistisch nicht signifikant. Aggrecan und ADAMTS 5 wurden nach der Transfektion zuerst vermindert exprimiert und stiegen im weiteren Verlauf über das Niveau der Vergleichszellen an. Die Expression von Sox 9 stieg nach der Transfektion auf ca. 320 % an und lag während der weiteren Kultivierung auf dem Referenzniveau. Im Fall von Runx 2 war die Menge an

mRNA nach der Transfektion in P2 auf 32 % und in P3 auf 39 % der Menge in den nicht transfizierten CPC reduziert.

In Tabelle 20 ist eine Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse dargestellt.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
GFP P2 / P2	Kollagen I	0,19	0,14 - 0,26	0,08 - 0,50	0,000	DOWN
	Kollagen II	0,84	0,29 - 2,04	0,20 - 3,25	0,506	
	MMP 13	1,29	0,57 - 3,09	0,31 - 8,00	0,396	
	Aggrecan	0,51	0,43 - 0,62	0,29 - 0,76	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,74	0,62 - 0,87	0,57 - 0,93	0,000	DOWN
	Sox 9	3,20	1,57 - 4,93	1,07 - 6,06	0,000	UP
	Runx 2	0,32	0,27 - 0,38	0,23 - 0,41	0,000	DOWN
GFP P3 / P3	Kollagen I	0,63	0,50 - 0,81	0,44 - 0,93	0,000	DOWN
	Kollagen II	0,78	0,23 - 3,03	0,14 - 3,73	0,473	
	MMP 13	0,88	0,50 - 1,52	0,27 - 2,14	0,482	
	Aggrecan	1,39	1,07 - 1,63	0,87 - 3,48	0,003	UP
	ADAMTS 5	1,70	1,52 - 2,00	1,32 - 2,30	0,000	UP
	Sox 9	1,11	0,47 - 2,34	0,35 - 59,71	0,976	
	Runx 2	0,39	0,32 - 0,47	0,23 - 0,50	0,000	DOWN

Tabelle 20: Relative Quantifizierung der Genexpression zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 2. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Bei den Zellen der dritten CPC-Population konnten nach der Transfektion folgende Veränderungen des Genexpressionsmusters im Vergleich mit den nicht transfizierten Zellen festgestellt werden. Im Fall von Kollagen I konnte in P2 eine leichte Verringerung beobachtet werden, wohingegen sich der Gehalt an Kollagen I in P3 nicht signifikant von dem Vergleichsniveau unterschied. Die Expression von Kollagen II stieg nach der Transfektion bis

auf 549 % in P3 an, wobei sie in P2 noch nicht signifikant erhöht war. Die Marker MMP 13 und Runx 2 blieben in etwa auf dem selbem Niveau wie bei den nicht transfizierten CPC. Die Menge an Aggrecan war posttransfunktional um 87 % und in P3 um 37 % geringer als ohne Transfektion. Die Expression von ADAMTS 5 war gegenüber den Referenzproben zunächst deutlich verringert, wuchs aber in P3 auf das 1,27fache an. Der Level von Sox 9 lag nach der Transfektion leicht über den Vergleichswerten, im weiteren Verlauf sank dieser auf ca. die Hälfte der Referenz.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse gibt die Tabelle 21.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
GFP P2 / P2	Kollagen I	0,57	0,38 - 0,95	0,11 - 1,32	0,007	DOWN
	Kollagen II	1,45	0,37 - 5,77	0,12 - 19,70	0,445	
	MMP 13	0,67	0,31 - 1,41	0,20 - 2,00	0,090	
	Aggrecan	0,13	0,07 - 0,24	0,05 - 0,35	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,17	0,13 - 0,20	0,12 - 0,23	0,000	DOWN
	Sox 9	1,33	1,07 - 1,74	0,87 - 2,14	0,004	UP
	Runx 2	1,16	0,92 - 1,52	0,76 - 2,00	0,130	
GFP P3 / P3	Kollagen I	1,28	0,81 - 2,14	0,54 - 2,64	0,112	
	Kollagen II	5,49	2,83 - 12,13	1,74 - 14,93	0,000	UP
	MMP 13	1,00	0,17 - 4,00	0,04 - 11,31	0,995	
	Aggrecan	0,63	0,47 - 0,87	0,41 - 1,23	0,003	DOWN
	ADAMTS 5	1,27	1,00 - 1,63	0,81 - 1,87	0,016	UP
	Sox 9	0,52	0,28 - 0,95	0,18 - 1,32	0,002	DOWN
	Runx 2	0,91	0,66 - 1,23	0,47 - 1,74	0,463	

Tabelle 21: Relative Quantifizierung der Genexpression zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 3. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

Die Untersuchungen an den Zellen aus Fall 4 zeigten nach der Transfektion eine deutliche Abnahme des Gehaltes an Kollagen I, wohingegen in P3 die Menge an Kollagen I auf das 2,11fache angestiegen war. Die Expression von Kollagen II und MMP 13 zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich von transfizierten und nicht transfizierten CPC. Im Fall von Aggrecan und ADAMTS 5 zeigten die Untersuchungen eine deutliche Abnahme der Genexpression nach der Transfektion. Die Menge von Sox 9 war posttransfunktional auf 232 % erhöht. In P3 bestand aber kein signifikanter Unterschied zum Referenzniveau. Die Expression von Runx 2 war nach der Transfektion unverändert und lag dann in Passage 3 etwas unterhalb des Niveaus in der Vergleichprobe.

Die Tabelle 22 gibt eine Übersicht über diese Ergebnisse.

	Gen	Ratio	Std. Fehler	95 % K.I.	p-Wert	Wertung
GFP P2 / P2	Kollagen I	0,35	0,17 - 0,60	0,13 - 1,23	0,001	DOWN
	Kollagen II	0,56	0,17 - 1,74	0,08 - 4,93	0,179	
	MMP 13	1,32	0,40 - 7,10	0,17 - 12,13	0,564	
	Aggrecan	0,13	0,10 - 0,19	0,09 - 0,25	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,10	0,06 - 0,20	0,03 - 0,33	0,000	DOWN
	Sox 9	2,32	1,21 - 4,08	0,35 - 9,85	0,008	UP
	Runx 2	0,87	0,57 - 1,17	0,47 - 2,14	0,320	
GFP P3 / P3	Kollagen I	2,11	1,27 - 4,60	0,62 - 7,46	0,008	UP
	Kollagen II	0,83	0,35 - 1,87	0,19 - 4,00	0,504	
	MMP 13	0,95	0,29 - 3,81	0,11 - 6,50	0,902	
	Aggrecan	0,18	0,14 - 0,23	0,13 - 0,29	0,000	DOWN
	ADAMTS 5	0,70	0,56 - 0,95	0,25 - 1,32	0,004	DOWN
	Sox 9	0,86	0,60 - 1,32	0,38 - 1,74	0,281	
	Runx 2	0,67	0,47 - 0,93	0,35 - 1,32	0,003	DOWN

Tabelle 22: Relative Quantifizierung der Genexpression zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen mittels REST 2009 Software in der CPC-Population aus Fall 4. Ratio: mittlerer relativer Expressionsunterschied. 95 % K.I.: 95 %-Konfidenzintervall. p-Wert: Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit des beobachteten Unterschiedes, $p < 0.05$ wurde als

signifikant angenommen. Wertung: gibt die Richtung eines signifikanten Expressionsunterschiedes zwischen Probe und Kontrolle an.

In der Zusammenschau ergab der Vergleich der Expression der Markergene in den CPC mit und ohne Transfektion in Passage 2, dass Kollagen Typ I in allen untersuchten Zellpopulationen nach der Transfektion weniger vorhanden war. In zwei Fällen war diese Reduktion stark ausgeprägt mit einer Änderung um mehr als das Zweifache. Die Expression von Kollagen Typ II zeigte in drei von vier Fällen keine signifikanten Veränderungen und in einem Fall eine moderate Erhöhung mit einem *fold change* von 1,7. Auch das Kollagen II-abbauende Enzym MMP 13 blieb nach der Transfektion ohne statistisch signifikante Veränderung im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen. Die Expression von Aggrecan und seinem Gegenspieler ADAMTS 5 lag in allen CPC-Populationen deutlich unterhalb des Niveaus ohne Transfektion. Die Abnahme der Expression betrug für Aggrecan in allen Fällen und für ADAMTS 5 in drei Fällen mehr als die Hälfte. Eine Hochregulation der Genexpression in den transfizierten CPC ließ sich für Sox 9 nachweisen, wobei diese in zwei Fällen mit einem *fold change* von mehr als 2 deutlich ausgeprägt war. Im Gegensatz hierzu war die mRNA-Menge an Runx 2 in zwei von vier Fällen deutlich vermindert (*fold change* -5,9; -3,1) und in den anderen beiden Fällen nicht signifikant verändert zur Referenzgruppe. In der Frage ob die gefundenen Veränderungen während der weiteren Kultivierung Bestand hatten lässt sich festhalten, dass kein so einheitliches Bild mehr zu beobachten war. So war Kollagen I nur noch in zwei Fällen vermindert exprimiert, hiervon einmal deutlich, und in den anderen beiden Fällen auf das Niveau der Referenzgruppe oder sogar darüber hinaus angestiegen. Kollagen II blieb in zwei Fällen ohne signifikante Veränderungen. In den übrigen zwei Beobachtungen war die Menge von Kollagen II einmal nicht mehr signifikant vermehrt und einmal während der Kultivierung noch deutlich weiter angestiegen (*fold change* 5,5). Die Expression von MMP 13 war auch in Passage 3 in allen Populationen zur Gruppe der nicht transfizierten CPC nicht signifikant verändert. Im Fall von

Aggrecan blieb die Genexpression auch in Passage 3 bei drei Zellpopulationen vermindert (*fold change* -3; -1,6; -5,6), bei der anderen stieg sie moderat über den Vergleichswert an. Die Untersuchungen zeigten, dass die ADAMTS 5-Expression nur in einem Fall weiterhin signifikant verringert blieb. In den anderen Fällen war sie einmal ohne statistische Signifikanz und zweimal über das Referenzniveau angestiegen, wobei die Unterschiede in allen Fällen nur mäßig ausgeprägt waren. Der chondrogene Entwicklungsmarker Sox 9 sank während der weiteren Kultivierung in zwei Fällen von einer deutlich erhöhten Expression auf das Niveau der nicht transfizierten CPC und einmal von einer mäßigen Erhöhung sogar deutlich unter das Referenzniveau ab (*fold change* -2). Die Expression von Runx 2 war in Passage 3 weiterhin vermindert, so dass drei von vier Werten signifikant unterhalb der in den nicht transfizierten Zellen lagen und der übrige Wert in diesem Vergleichsniveau blieb. Es lässt sich jedoch festhalten, dass die Reduktion mit *fold changes* von -2,2 und -2,6 im Vergleich zur Passage 2 weniger ausgeprägt war.

4. Diskussion

4.1 Migrationspotential

Die Migration von Zellen ist ein Vorgang, der im menschlichen Organismus von der Konzeption an bis zum Tod allgegenwärtig ist (MORALES 2007). Sie ist Voraussetzung für die Bildung von Gewebe während der Embryonalentwicklung, für die Angiogenese, für die Immunantwort des Körpers sowie für die Wundheilung, wohingegen eine unkontrollierte Migration eine wichtige Rolle bei degenerativen Prozessen und der Tumormetastasierung einnimmt (FRIEDL und BRÖCKER 2000; MORALES 2007). Die Migration kann hierbei in der Form von einzelnen Zellen oder als Zellverband stattfinden (FRIEDL und WOLF 2010). Die Migration individueller Zellen erfolgt entweder amöboid oder mesenchymal, wobei die amöboide Form durch lockere und rasch wechselnde Zell-Matrix-Bindungen gekennzeichnet ist, was eine schnelle und multidirektionale Fortbewegung - wie z. B. bei Lymphozyten - ermöglicht (SCHMIDT und FRIEDL 2010). Die mesenchymale Migration hingegen ist durch stabilere Verbindungen zwischen der Zelle und der EZM charakterisiert und wird z. B. von Fibroblasten aber auch Krebszellen genutzt (SCHMIDT und FRIEDL 2010). Aufgrund der engeren Interaktion der Zellen mit der EZM resultiert sie in einer langsameren und weniger freien Migration (FRIEDL et al. 1998). Besonders ein dichtes Kollagennetzwerk mit geringen Maschengrößen, wie im Knorpel vorhanden, stellt ein schwieriges Hindernis für eine Zellmigration dar (MORALES 2007). Um eine solche mechanische Barriere zu überwinden, verformen die Zellen sich z. T. extrem oder passen die EZM durch den Einsatz proteolytischer Enzyme ihren Bedürfnissen an (FRIEDL und WOLF 2010; WOLF und FRIEDL 2009).

Die in arthrotischem Knorpelgewebe entdeckte CPC-Population stellt aufgrund ihres chondrogenen Potentials und ihrer Fähigkeit zur Migration eine mögliche Perspektive für die zukünftige Behandlung der Osteoarthritis

dar (KOELLING et al. 2009). Diese Fähigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* eingehend untersucht, um ein mögliches Verhalten der CPC *in vivo* und ihre Einsatzmöglichkeiten für künftige Therapien zu prüfen.

4.1.1 Fähigkeit der CPC zur Migration *in vitro*

Die durchgeführten In-vitro-Migrationsassays untersuchten die Fähigkeit der CPC zur Migration *in vitro*. Eine grundsätzliche Fähigkeit der CPC zur Migration zeigte sich bereits in der Methode mit der die Zellen gewonnen werden konnten, da die CPC hierbei selbständig aus den Gewebestücken auswuchsen. Auf diese Weise konnten auch aus Rinderknorpel Zellen mit chondrogenem Potential gewonnen werden, wobei dies besonders effektiv mit Proben aus tiefen Knorpelzonen und Jungtieren gelang (BOS et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden zudem verschiedene Wachstumsfaktoren und Lockstoffe eingesetzt, um einen möglichen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit zu untersuchen. Bei den verwendeten Stoffen handelte es sich um TGF- β 3 und BMP-6, da sie zurzeit die bedeutendsten Wachstumsfaktoren zur Induktion einer chondrogenen Differenzierung bei adulten Stammzellen darstellen (PUETZNER et al. 2010) und außerdem die Migrationfähigkeit von Zellen beeinflussen können. So konnte unter dem Einsatz von BMP (FRENKEL et al. 1996) und TGF- β (CHANG et al. 2003) eine gezielte Migration von Chondrozyten beobachtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die verwendeten CPC in der Lage sind, *in vitro* zu migrieren, wie es auch SEOUL et al. (2012) bei ihrer CPC-Population feststellen konnten.

Durch den Einsatz von FBS und TGF- β 3 konnte die Bereitschaft der CPC zur Migration deutlich gesteigert werden.

Die Fähigkeit von TGF- β 3 die Migration von Zellen zu beeinflussen wurde auch in anderen Untersuchungen belegt. So zeigte eine Studie, in der an Kaninchen einseitig die Gelenkoberflächen des proximalen Humerus chirurgisch entfernt und durch anatomisch-korrekt nachgebildete Bioscaffolds

ersetzt wurden, dass durch den Einsatz von TGF- β 3 die Einwanderung von Zellen in die Bioscaffolds deutlich gesteigert werden konnte (LEE et al. 2010). Auch In-vitro-Migrationsversuche mit einer multipotenten mesenchymalen Progenitorzelllinie wiesen einen stimulierenden Effekt von TGF- β 3 auf das Migrationsverhalten nach (MAKHIJANI et al. 2005). Die gezeigte chemotaktische Beeinflussung der CPC durch TGF- β 3 könnte somit auf einen Ursprung der CPC aus dem Knochenmark hinweisen. Des Weiteren geben diese Ergebnisse Hoffnung auf eine mögliche zukünftige therapeutische Nutzung der CPC. So könnten in einem ähnlichen Ansatz, wie er durch LEE et al. (2010) gezeigt wurde, Knorpeldefekte mit TGF- β 3-beladenen Bioscaffolds gefüllt werden und durch den Einsatz des Wachstumsfaktors vermehrt CPC in diese Scaffolds rekrutiert werden, um die Selbstheilungsfähigkeiten des Knorpels zu stärken. Bevor eine solche Nutzung in greifbare Nähe rücken kann, müsste vorerst in weiteren Versuchen die Rolle der CPC im Rahmen der Pathogenese der Osteoarthrose näher untersucht werden.

Der Einsatz von BMP-6 erhöhte in dieser Arbeit die Migrationsrate der untersuchten CPC nicht. Im Gegensatz hierzu konnten Studien zeigen, dass auch BMP Stimulatoren von Zellmigration sein können (PI et al. 2007; FRENKEL et al. 1996). So induzierte BMP-6 in intraembryonalen Endothelzellen aus Mäusen über Myosin X die Bildung von Filopodien, mit denen die Zellen in der Lage waren eine gerichtete Fortbewegung entlang eines BMP-6 Gradienten zu vollführen (PI et al. 2007). PI et al. (2007) konnten auch zeigen, dass eine Vorbehandlung der intraembryonalen Endothelzellen mit BMP-6 die Migrationsrate entlang des BMP-6 Gradienten steigerte. Ein möglicher Grund für die fehlende Wirkung von BMP-6 auf die untersuchten CPC könnte daher darin liegen, dass in dieser Arbeit keine Präinkubation mit BMP-6 erfolgt war. Außerdem zeigen Studien, dass der chondrogene Effekt von BMP-6 bei MSC ohne die Anwesenheit von TGF- β 3 deutlich geringer ausgeprägt ist (SEKIYA et al. 2001; ESTES et al. 2006; DIEKMANN et al. 2010). Analog könnte die geringe chemotaktische Wirkung

von BMP-6 auf die CPC durch die Testung ohne die Kombination mit TGF- β 3 bedingt sein, was ebenfalls einen Hinweis für eine Herkunft der CPC aus dem Knochenmark darstellen würde. Um die Ursache näher zu beleuchten, erscheinen weitere Versuche zum Einfluss von BMP-6 sinnvoll. So könnten In-vitro-Migrationsassays einmal nach Präinkubation der CPC mit BMP-6 und einmal mit der Kombination von BMP-6 und TGF- β 3 durchgeführt werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben keine Unterschiede bezüglich der Fähigkeit oder der Bereitschaft zur Migration *in vitro* im Vergleich zwischen den transfizierten und den nicht transfizierten CPC. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass das *ex vivo* gezeigte Migrationsverhalten der transfizierten CPC auch in gleicher Weise für nicht transfizierte CPC zutrifft.

4.1.2 Fähigkeit der CPC zur Migration ex vivo

Die Fähigkeit in geschädigtes Gewebe zu migrieren konnte für aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen sowohl im Tiermodell als auch in menschlichem Gewebe und zum Teil *in vivo* beobachtet werden (PROCKOP 2009; SPEES et al. 2008; FERRARI et al. 1998; PEREIRA et al. 1998; PEREIRA et al. 1995). Eine traumatische Zellschädigung und eine Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen fungieren hierbei als chemo-taktische Stimulatoren für Progenitor- und Stammzellen (SEOL et al. 2012). Die Ex-vivo-Migrationsversuche der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die untersuchten CPC in der Lage sind, selbstständig *ex vivo* in arthrotisches Knorpelgewebe einzuwandern. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam eine Studie von SEOL et al. (2012), in der in den oberflächlichen Schichten von sowohl bovinem als auch humanem Knorpel eine Population von lokalen Progenitorzellen nachgewiesen wurde, die auch mechanisch geschädigtes Gewebe bevölkern konnten. Auch in Versuchen mit MSC konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden, so bevölkerten MSC nach intraartikulärer Injektion osteoarthrotisches Knorpelgewebe und waren in der Lage die Progression der OA zu mindern (MOKBEL et al. 2011,

AGUNG et al. 2006). Einige MSC entwickelten im Gewebe einen chondrozytären Phänotyp (MOKBEL et al. 2011), oder zeigten neu synthetisierte knorpelartige EZM in ihrer direkten Umgebung im Sinne eines Reparationsversuches (AGUNG et al. 2006). Daher stellt die Fähigkeit zur selbständigen Migration in osteoarthrotisches Knorpelgewebe einen Ausgangspunkt für eine mögliche therapeutische Nutzung der CPC in Zukunft dar, da sie eine einfache und wenig invasive Möglichkeit zur Applikation aufzeigt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant in weiteren Untersuchungen zu klären, ob und in welcher Art die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CPC *ex vivo* ebenfalls EZM synthetisieren und ob eine Differenzierung in Chondrozyten erfolgt.

In den Ex-vivo-Migrationsversuchen ließen sich bezüglich Geschwindigkeit und Dynamik der Migration deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen CPC-Populationen erkennen. Diese Beobachtung deutet auf das Vorhandensein von interindividuellen Unterschieden im Migrationsverhalten der CPC-Populationen hin, die auf einer unterschiedlichen quantitativen Zusammensetzung der CPC-Populationen im Hinblick auf schnellere und langsamere Zellen beruhen könnten. Hierfür spricht, dass die untersuchten CPC eine in sich heterogene Gruppe von Zellen darstellen (KOELLING et al. 2009). Andererseits könnten auch interindividuelle Unterschiede in der Beschaffenheit des Knorpelgewebes der verwendeten Knorpelstanzen für das unterschiedliche Einwanderungsverhalten verantwortlich sein. Da die Auswahl der Region für die Knorpelstanzung und auch die Einschätzung des Stadiums der OA in diesem Bereich nur durch die makroskopische Betrachtung erfolgten, können unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen der EZM in den einzelnen Proben nicht ausgeschlossen werden. Ein Ansatz zur Klärung dieser Frage wäre es, unterschiedlich markierte CPC-Populationen aus verschiedenen Spendern in dasselbe Knorpelgewebe sowie dieselben CPC in verschiedene Knorpelproben einwandern zu lassen.

Für die Vermutung von unterschiedlich schnellen Zellen spricht, dass es in allen untersuchten CPC-Populationen zu jedem Beobachtungszeitpunkt eine große Spannweite zwischen der minimalen und maximalen gemessenen Eindringtiefe in das Knorpelgewebe gab. Dieses Phänomen war sowohl im G-Knorpel als auch im R-Knorpel zu beobachten und deutet darauf hin, dass innerhalb der einzelnen Populationen schnellere und langsamere Zellen existieren. Eine ähnliche Beobachtung konnte in einer anderen Studie gemacht werden, bei der fluoreszenzmarkierte CPC in einem Abstand von ca. 4 mm zu einer frischen traumatischen Schädigung auf die Oberfläche einer Knorpelprobe aufgebracht wurden (SEOL et al. 2012). Hierbei nahm die Anzahl der an der Wundfläche gefundenen CPC mit zunehmender Dauer von Tag 2, an dem nur wenige CPC gefunden wurden, bis Tag 12 deutlich zu (SEOL et al. 2012). Diese Beobachtung spricht ebenfalls für das Vorkommen von Zellen mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten innerhalb der CPC-Populationen.

Auch innerhalb einer Chondrozytenpopulation konnten unter zweidimensionalen In-vitro-Bedingungen mit *time-lapse-video*-Mikroskopie deutliche Unterschiede bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden, wobei die gemessenen Werte zwischen 5 $\mu\text{m/h}$ und über 50 $\mu\text{m/h}$ lagen (MORALES 2007). Eine weitere Studie beobachtete eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von ca. 10 $\mu\text{m/h}$ für Chondrozyten (MANIWA et al. 2001). Ausgehend von den durchschnittlich zurückgelegten Distanzen an den ersten Beobachtungszeitpunkten erscheinen die an Chondrozyten gemessenen durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeiten auch für die CPC zutreffend. Die CPC scheinen damit bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit - wie Chondrozyten - eine in sich heterogene Gruppe von Zellen zu sein und in der Masse langsamer zu wandern als viele andere Säugetierzellen, bei denen Geschwindigkeiten bis zu 720 $\mu\text{m/h}$ beobachtet wurden (CHANG et al. 2003). Die geringen Migrationsgeschwindigkeiten der CPC könnten durch den hohen Kollagengehalt der EZM bedingt sein, da Zellen sich in solchen Geweben

durch mesenchymale Migration fortbewegen und diese eine geringere Migrationsgeschwindigkeit bedingt (SCHMIDT und FRIEDL 2010). So beobachteten FRIEDL et al. (1998), dass Fibroblasten innerhalb einer dreidimensionalen Kollagenmatrix mit 0,2- bis 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ deutlich langsamer wanderten als kleinere Zellen, wie T-Lymphozyten. Sie folgerten daraus, dass innerhalb einer solchen EZM eine zunehmende Zellgröße in einer abnehmenden Migrationsgeschwindigkeit resultiert (FRIEDL et al. 1998).

In den Ex-vivo-Migrationsversuchen wurden von der Mehrzahl der Zellen Tiefen zwischen 800 μm und 1900 μm erreicht, wobei sich die mittleren 50 % der drei Zellpopulationen an Tag 14 im G- und R-Knorpel jeweils in einem ähnlichen Bereich des Gewebes befanden. Im Unterschied hierzu überwand die CPC in der Studie von SEOL et al. (2012) innerhalb von maximal zwölf Tagen ca. 4000 μm . Dass auch die CPC dieser Arbeit in der Lage sind, solche Distanzen zu überwinden, zeigt die CPC-Population aus Fall 3 an Tag 9 im G-Knorpel, bei der eine maximale Tiefe von 3555 μm gemessen worden war. Da SEOL et al. (2012) nur den Endpunkt nach 4 mm und nicht die Distanz dazwischen untersuchten, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die CPC nach zwölf Tagen mehrheitlich am Zielpunkt aufhielten oder das Hauptfeld in einer ähnlichen Tiefe wie die CPC der vorliegenden Arbeit lagen. Falls es sich tatsächlich um einen deutlichen Unterschied im Migrationsverhalten handeln sollte, könnte ein Grund für die Unterschiede in der zurückgelegten Distanz die unterschiedliche Migrationsrichtung sein. In der Studie von SEOL et al. (2012) wanderten die CPC tangential zur Knorpeloberfläche, wohingegen die Einwanderungsbewegung in der vorliegenden Arbeit vertikal zur Oberfläche, in die Tiefe gerichtet war. Dies ist deshalb bedeutsam, da die superfizielle Knorpelzone vorwiegend tangential ausgerichtete Kollagenfasern enthält (BUCKWALTER und MANKIN 1998a; POOLE CA 1997), wodurch es für CPC leichter sein könnte, sich entlang dieser Fibrillen fortzubewegen, als quer zu ihnen in die Tiefe vorzudringen. FRIEDL und WOLF (2010) zeigten, dass die Eigenschaften der EZM, wie Dichte, Rigidität und Orientierung der Fibrillen,

einen Einfluss auf die Effizienz und Geschwindigkeit der Migration ausüben. Auch eine arthrosebedingt begrenzte maximale Eindringtiefe in den Ex-vivo-Migrationsversuchen könnte zu den Unterschieden in der zurückgelegten Distanz beitragen. Ein weiterer Grund für die Unterschiede in der zurückgelegten Distanz könnte der unterschiedliche Ort der Gewebeschädigung sein, da die durch die Gewebeschädigung freigesetzten Zellbestandteile als kräftige Chemoattraktoren auf CPC wirken (SEOL et al. 2012). Für die Vermutung einer solchen Zielzone spricht, dass es im R-Knorpel zwischen Tag 5 und Tag 14 zu kaum einer Zunahme der medianen Einwanderungstiefe gekommen war. Im G-Knorpel konnte zwar eine deutliche Zunahme der zurückgelegten Distanzen von Tag 5 bis Tag 14 beobachtet werden, allerdings deutet die Entwicklung der medianen Einwanderungstiefen darauf hin, dass die Migrationsgeschwindigkeit im Verlauf der Versuche abgenommen hat, was ebenfalls für das Vorliegen einer Zielregion sprechen könnte. Diese Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit steht zwar im Gegensatz zu den von MORALES (2007) und MANIWA et al. (2001) an Chondrozyten erhobenen konstanten Geschwindigkeiten, allerdings sind diese unter zweidimensionalen In-vitro-Bedingungen erhoben worden. Aus den vorliegenden Daten kann nicht mit Bestimmtheit geklärt werden, ob die Abnahme der Migrationsgeschwindigkeiten auf die dreidimensionalen Ex-vivo-Bedingungen zurückzuführen ist oder darauf, dass die Zellen bereits in einer Art Zielregion angekommen waren. Da nicht dieselben Zellen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten beobachtet werden konnten, war eine exakte Bestimmung der Entwicklung der Migrationsgeschwindigkeiten unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich. Die an allen Beobachtungstagen vorhandene große Spannbreite zwischen minimaler und maximaler Eindringtiefe steht der Vermutung einer für alle Zellen einheitlichen Zielregion entgegen. Weitere Untersuchungen zum Migrationsverhalten erscheinen daher notwendig, um zu klären, ob eine einheitliche Zielregion besteht. Ein möglicher Ansatzpunkt zur weiteren Klärung dieser Frage wäre die

Durchführung eines Ex-vivo-Migrationsversuchs mit längerer Beobachtungsdauer, um festzustellen, ob sich die Hauptfelder der CPC noch weiter in die Tiefe des Gewebes orientieren oder die in dieser Arbeit gefunden Ergebnisse von Tag 14 einen Endpunkt der Ausbreitungstendenz im Gewebe darstellen.

4.1.3 Vergleich zwischen dem Ex-vivo-Migrationsverhalten in R- und G-Knorpel

Für die Bestimmung von Unterschieden im Ex-vivo-Migrationsverhalten der CPC in R- und G-Knorpel konnten nur die Ergebnisse aus den Versuchen mit den Populationen aus Fall 1 bis Fall 3 bewertet werden, da nur hier Knorpelgewebe aus R- und G-Bereichen desselben Gelenkes mit der gleichen CPC-Population inkubiert wurde. Es zeigt sich, dass die CPC in allen drei Fällen zu jedem Beobachtungszeitpunkt tiefer in das Knorpelgewebe aus dem G-Bereich als in den Knorpel aus dem R-Bereich eingewandert sind. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass im G-Knorpel nicht nur einzelne Zellen der Zellpopulationen, sondern auch ihre Hauptfelder mit zunehmender Dauer der Versuche tiefer in das Knorpelgewebe vordrangen, während im R-Knorpel die Masse der Zellen zwischen Tag 5 und Tag 14 eher ortständig verblieb. Diese Unterschiede könnten zum einen durch eine größere Dicke des Knorpels aus dem G-Bereich bedingt sein, da die CPC hierdurch auch tiefer einwandern könnten. Zum anderen könnten diese Unterschiede durch eine unterschiedliche Zielregion im jeweiligen Stadium der OA bedingt sein. Es bleibt dabei zu beachten, dass die Abnahme der Knorpeldicke im Verlauf der OA von der oberflächlichen Zone aus fortschreitet (SULZBACHER 2000). Somit könnten sich die CPC-Populationen im G- und R-Knorpel trotz der festgestellten Unterschiede in der gleichen Zielzone bzw. Region der ursprünglichen Knorpelarchitektur befinden. Zur Klärung der Ursache der in dieser Arbeit gefunden Unterschiede im Verhalten der CPC in unterschiedlichen OA-Stadien sind weitere Untersuchungen in Zukunft notwendig. Des Weiteren lassen die Beobachtungen vermuten, dass die relevante Migrationsaktivität im R-

Knorpel bereits in einer früheren Phase der Ex-vivo-Migrationsversuche stattgefunden hatte.

Eine frühe Phase der Migration im R-Knorpel wurde in den zusätzlichen Ex-vivo-Migrationsversuchen untersucht. Die Versuche zeigen, dass die Zellen in beiden Fällen bereits an Tag 2 sehr tief eingewandert waren. In beiden Fällen waren die CPC an Tag 3 nicht tiefer in das Gewebe vorgedrungen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Migration in Gewebe aus dem R-Bereich insgesamt ein schneller Prozess ist. Die Geschwindigkeit des Migrationsprozesses scheint von der Beschaffenheit des Gewebes abhängig zu sein, da die Zellen aus den Fällen 5 und 6 nach 2 Tagen tiefer in das Gewebe eingedrungen waren als die meisten Zellen aus den Fällen 1 bis 3 bis Tag 14. Um die Frühphase der Migration besser zu dokumentieren, müssten weitere Ex-vivo-Migrationsversuche mit deutlich früheren und engmaschigeren Beobachtungszeitpunkten durchgeführt werden. Die fehlende Zunahme der Einwanderungstiefe von Tag 2 zu Tag 3 könnte ebenfalls andeuten, dass sich die Zellen bereits in einer Zielregion befanden. Andererseits könnte diese Beobachtung durch die Verwendung von Gewebeproben von unterschiedlichen Spendern und damit durch die interindividuellen Besonderheiten des Knorpelgewebes bedingt sein.

Ein weiterer Unterschied zwischen G- und R-Knorpel war das Verteilungsmuster der CPC. So waren die Zellen im G-Knorpel eher homogen verteilt, während sie im R-Knorpel häufig in Clustern und entlang von Defekten in der EZM zu finden waren. Das Auftreten der CPC in Clustern könnte Ausdruck eines Reparaturversuchs sein, wie er auch bei Chondrozyten im Verlauf der OA bekannt ist (HORTON et al. 2005). Das unterschiedliche Ausbreitungsverhalten ist am ehesten auf die unterschiedliche Struktur zurückzuführen. So ist die EZM in den Ex-vivo-Migrationsversuchen im R-Knorpel, der Arthrosetadieneinteilung von SULZBACHER (2000) folgend, in den oberen Schichten aufgelockerter und die Oberfläche weist deutlich ausgeprägter Fissuren auf als im G-Knorpel.

Daher erscheint es nachvollziehbar, dass eine Ausbreitung der CPC im R-Knorpel vornehmlich entlang dieser präformierten Strukturen erfolgte. Unerwartet war die Beobachtung, dass die CPC im R-Knorpel im direkten Vergleich mit dem G-Knorpel weniger weit in das Gewebe eingedrungen sind, da vorher die Vermutung bestand, dass die fortgeschritteneren Schäden an der EZM im R-Knorpel die Einwanderung der CPC begünstigen würden. Die geringere Tiefe könnte durch eine der Arthrose geschuldete insgesamt verringerte Knorpeldicke (Sulzbacher 2000) in den R-Knorpelproben bedingt sein.

4.2 Proliferationsfähigkeit ex vivo

Die Ex-vivo-Migrationsversuche zeigten, dass die CPC bis zum Endzeitpunkt der Versuche nach 14 Tagen sowohl im R-Knorpel als auch im G-Knorpel vital geblieben waren. Die sich mit der Versuchsdauer verändernden Migrationstiefen sprechen für diese Beobachtung. Ebenso gestützt werden diese Ergebnisse durch andere Studien, in denen den CPC ähnliche Zellen innerhalb von 3D-Umgebungen für Zeitspannen, die deutlich über der Versuchsdauer der vorliegenden Arbeit liegen, vital erhalten werden konnten. So konnte die Vitalität von MSC unter In-vitro-Bedingungen in 3D-Scaffolds aus Knorpel-EZM bis zu drei Wochen nachgewiesen werden, wobei die Scaffolds von ähnlichem Durchmesser und Dicke wie die Knorpelschicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebestanzten waren (ZHAO et al. 2013). In einer In-vitro-Studie mit Chondrozyten aus Ratten, die in 3D-Scaffolds unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert wurden, waren diese auch nach 28 Tagen noch vital (CHOMCHALAO et al. 2013). In Agarosehydrogel mit TGF- β 3 konnten MSC und Chondrozyten unter In-vitro-Kulturbedingungen sogar bis zu 42 Tage vital erhalten werden (BUCKLEY et al. 2012; VINARDELL et al. 2011).

Die Ex-vivo-Migrationsversuche konnten außerdem zeigen, dass die CPC nicht nur innerhalb des osteoarthrotischen Knorpelgewebes überleben können, sondern auch in der Lage sind, in dem Gewebe zu proliferieren. Die

Fähigkeit von CPC zur Proliferation *ex vivo* konnte auch die Arbeit von SEOL et al. (2012) nachweisen, allerdings ohne Angaben zu einer möglichen Dauer der Proliferationsfähigkeit. Untersuchungen an MSC *in vitro* zeigten eine Proliferationsfähigkeit für mindestens 35 Tage (AGUNG et al. 2006). Eine andere Studie, die humane Zellen aus dem Annulus fibrosus von Bandscheiben *in vitro* in einem 3D-Scaffold kultivierte, konnte über einen Zeitraum von vier Wochen eine Proliferationsfähigkeit nachweisen (HELEN und GOUGH 2008). Sämtliche dieser Studien sind zwar nicht mit CPC erhoben worden, sie lassen aber die in der vorliegenden Arbeit gefundene Dauer der Proliferationsfähigkeit der CPC von bis zu 14 Tagen möglich erscheinen, da sie an den CPC ähnlichen Zellen durchgeführt wurden. In der vorliegenden Arbeit war in allen Fällen zum Endpunkt der Beobachtungen hin eine Abnahme der Anzahl an proliferationsfähigen CPC festzustellen. Diese Abnahme könnte auf einer schlechteren Versorgung mit Nährstoffen beruhen, die durch eine mit zunehmender Versuchsdauer abnehmende Diffusionskapazität des Knorpelgewebes bedingt sein könnte. Eine andere Ursache könnte in der Exposition mit dem osteoarthrotischen Gewebe liegen, da dieses als schädliche Umgebung für Zellen gilt (DEALY 2012). Da bezüglich der Dauer der Proliferationsfähigkeit im G-Knorpel und R-Knorpel keine Unterschiede bestehen, scheint weniger das Stadium der Arthrose als die Versuchsdauer entscheidend zu sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine eventuelle Anwendung der CPC in osteoarthrotischem Knorpelgewebe zumindest für die hier untersuchten Zeiträume möglich wäre. Weitere Untersuchungen zu einem längerfristigen Ex-vivo-Verbleib der Zellen im Gewebe und den Auswirkungen auf Proliferationsfähigkeit sowie Vitalität sind in Zukunft sicherlich notwendig. Einen Schlüsselpunkt wird hierbei die langfristige Versorgung der CPC mit Nährstoffen in einem Ex-vivo-System darstellen.

4.3 Genexpressionsmuster

4.3.1 Differenzierungsrichtung in Passage 0

Die biochemischen Untersuchungen der CPC in Passage 0 ergaben ein sehr deutliches Übergewicht von Kollagen I zu Kollagen II auf Ebene der mRNA. Dies unterscheidet sie von differenzierten Chondrozyten bei denen Kollagen II deutlich überwiegt (TAKAHASHI et al. 2010). Sie ähneln hierin mehr MSC, die sowohl im undifferenzierten als auch chondrogen beeinflussten Zustand ebenfalls mehr Kollagen I als Kollagen II exprimieren (GOESSLER et al. 2006a). Eine Arbeit von SEOL et al. (2012) konnte zeigen, dass sich CPC auch von MSC durch eine vermehrte Expression von Kollagen II und Aggrecan unterscheiden. Die vermehrte Expression von Aggrecan und Sox 9 im Vergleich zu ADAMTS 5 und Runx 2 spricht für eine eher chondrogene Ausrichtung der CPC, da beide als Marker einer chondrogenen Differenzierung gelten (KOLETTAS et al. 2001; GROGAN et al. 2009; ONO et al. 2013). Die Ergebnisse zeigen, dass die CPC eine Zelllinie mit chondrogener Ausrichtung darstellen, wobei sie von differenzierten Chondrozyten verschieden sind.

4.3.2 Einfluss der Transfektion auf die Genexpression

Die Transfektion der CPC mit maxGFP durch Nukleofektion führte zu einer zum Teil deutlichen Verringerungen (*fold change* -5,3) der Kollagen I-mRNA, wohingegen die Expressionen von Kollagen II und MMP 13 statistisch nicht signifikant verändert waren. Viel ausgeprägter fiel der Effekt auf Aggrecan und ADAMTS 5 aus, die im Maximum um das fast 17fache bzw. das Zehnfache vermindert waren. Der Vergleich der Entwicklungsmarker Sox 9 und Runx 2 zeigte eine Steigerung des chondrogenen Markers Sox 9 und eine Reduktion von Runx 2. Die Expressionslevel von Sox 9 und Runx 2 entwickelten sich sowohl in der In-vitro-Kultur als auch nach der Transfektion gegenläufig. Diese Beobachtungen entsprechen den bereits publizierten Ergebnissen (KOELLING et al. 2009) und weisen auf einen hemmenden

Effekt von Sox 9 auf die Expression von Runx 2 bei CPC hin, wie er für mesenchymale Progenitorzellen von ZHOU et al. (2006) nachgewiesen werden konnte. Die Abnahme von Kollagen I sowie die Zunahme von Sox 9 und die unveränderte Expression von Kollagen II könnten auf eine eher chondrogene Ausrichtung der CPC nach erfolgter Transfektion hindeuten. Allerdings spricht die Abnahme von Aggrecan, die die am meisten ausgeprägte Veränderung darstellt, dagegen, da es als ein Hauptprodukt differenzierter Chondrozyten gilt (KOLETTAS et al. 2001; GROGAN et al. 2009; ONO et al. 2013).

Die Ergebnisse lassen somit keinen eindeutigen chondrogenen oder fibroblastischen Effekt der Transfektion erkennen, da sowohl chondrogene als auch fibroblastische Marker reduziert waren. Vielmehr führte die Transfektion vornehmlich zu einer Reduktion der mRNA-Level, die ausgeprägter war als der Einfluss der Kultivierung *in vitro*. Die Verminderung der Expression fast aller Markergene könnte Ausdruck der Nebenwirkungen der Nukleofektion sein. Physikalische Transfektionsmethoden, zu denen auch die Nukleofektion bzw. die Elektroporation zählen, ermöglichen zwar die Transfektion von schwer zu transfizierenden Zellen wie Progenitor- und Stammzellen, allerdings weisen diese Methoden auch unerwünschte Nebeneffekte auf (MELLOT et al. 2013). So kommt es zu traumatischen Defekten in der Zellmembran, die die Zellen reparieren müssen, da sie bei Fortbestehen zum Zelltod führen können (MELLOT et al. 2013). Auch treten schädliche Veränderungen des pH-Wertes in der Zellumgebung auf (MELLOT et al. 2013). Der Stress, den die Zellen erfahren, spiegelt sich auch in der relativ zu anderen Transfektionsmethoden geringen Überlebensrate der eingesetzten Zellen wider, die den größten Nachteil der Elektroporation darstellt (MELLOT et al. 2013). Ebenso für die Vermutung, dass es sich um eine Reaktion auf den Stress der Nukleofektion handelt, spricht, dass die beobachteten Veränderungen im Expressionsmuster zwar in der weiteren *In-vitro*-Kultivierung noch nachweisbar waren, allerdings bereits eine Passage später deutlich rückläufig erschienen. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben

einen kleinen Einblick in den Effekt einer Transfektion auf das Genexpressionsmuster von CPC und auch eine ausführliche Literaturrecherche ergab nur wenige Hinweise auf die Auswirkungen einer Elektroporation auf das allgemeine Genexpressionsmuster, so dass weitere Untersuchungen in der Zukunft notwendig erscheinen. Um den Effekt der Elektroporation auf die Genexpression von mesenchymalen Progenitor- und Stammzellen genauer zu untersuchen, könnte anhand der CPC eine breiter angelegte Expressionsanalyse, z. B. durch Mikroarraytechnik, mit mehr Genen inklusive Indikatoren für zellulären Stress durchgeführt werden.

4.3.3 Einfluss der In-vitro-Kultur auf die Genexpression

Die biochemischen Untersuchungen der CPC mittels rt-qPCR erfolgten, um mögliche Veränderungen der Expression ausgewählter Markergene während der Kultivierung *in vitro* festzustellen. Es zeigten sich für die meisten untersuchten Gene interindividuelle Unterschiede zwischen den CPC-Populationen der einzelnen Fälle. So zeigte die Expression von Kollagen I über den Beobachtungszeitraum keine für alle Fälle einheitlichen Veränderungen, dennoch blieb festzuhalten, dass in drei von vier Fällen Kollagen I mit zunehmender Dauer der Kultur zunahm. Die Zunahme von Kollagen I unter Monolayerkulturbedingungen ist ein bekanntes Phänomen bei der Kultivierung von Chondrozyten und stellt ein Zeichen für deren Dedifferenzierung dar (TAKAHASHI et al. 2010; BENYA und SHAFFER 1982; KOLETTAS et al. 2001). In der Regel ist in diesem Zusammenhang ein direkt mit der Kultivierung verbundener Anstieg der Genexpression beschrieben, wie er durch HARDINGHAM T et al. (2002) gezeigt wurde. Ein solches Verhalten wurde an den CPC in einem Fall nachgewiesen, wobei in zwei Fällen zuerst eine Abnahme der Genexpression und danach moderate Zunahmen auftraten, die zu einem dem Ausgangswert gegenüber weniger reduziertem Niveau führten. Eine Untersuchung an humanen Chondrozyten aus dem Nasenseptum wies ebenso eine kurzfristige initiale Reduktion der Kollagen I Expression um ca. das Dreifache am Beginn einer 2D-Kultur auf

(GOESSLER et al. 2006b). Die Untersuchungen zeigten für Kollagen II in den ersten zwei Passagen mehrheitlich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression, ab Passage 3 nahm sie dann jedoch deutlich ab (*fold change* -1,8; -3,2; -7,1). Im Zuge der Dedifferenzierung von Chondrozyten in Monolayerkultur war ebenfalls erst ab der dritten Passage eine voranschreitende Verminderung der Expression von Kollagen II beobachtet worden (HARDINGHAM T et al. 2002).

Obwohl die Ergebnisse für Kollagen I und Kollagen II der vorliegenden Arbeit den bekannten Veränderungen an Chondrozyten unter vergleichbaren Kulturbedingungen ähnelt, waren die Veränderungen in der Genexpression bei den Chondrozyten in den Studien von HARDINGHAM T et al. (2002) und ONO et al. (2013) deutlich stärker ausgeprägt, da sie Zunahmen für Kollagen I um annähernd das Hundertfache und Abnahmen von Kollagen II mit *fold changes* von -100 bis über -1000 nachwies. Dieser Unterschied könnte dadurch bedingt sein, dass differenzierte Chondrozyten kaum Kollagen I und große Mengen Kollagen II exprimieren, wohingegen die CPC bereits höhere Mengen an Kollagen I und weniger Kollagen II exprimieren und somit bereits dedifferenzierten Chondrozyten ähneln. Daher könnten die Veränderungen an den CPC geringer ausgeprägt sein. Die beschriebenen Veränderungen im Expressionsmuster von Kollagen I und II konnten auch an anderen Chondrozyten-ähnlichen Zellen beobachtet werden. So wies eine Studie mit chondrogen beeinflussten induzierten pluripotenten Stammzellen eine Reduktion von Kollagen II und eine Zunahme von Kollagen I durch eine Monolayerkultivierung über drei Passagen nach (DIEKMAN et al. 2012). Auch hier fielen die Veränderungen in der Genexpression weniger stark als bei differenzierten Chondrozyten aus und lagen in einem ähnlichen Bereich wie bei den in dieser Arbeit untersuchten CPC. Die Level von MMP 13 waren durch die In-vitro-Kultivierung nicht signifikant beeinflusst und schwankten auch nur in einem moderaten Bereich um die Expression der Zellen aus Passage 0. Die relativ konstante Expression von MMP 13 erscheint anhand der Abnahme von Kollagen II unerwartet, da es sich bei MMP 13 um das

bedeutendste Kollagen II abbauende Enzym handelt (WANG et al 2011; KNÄUPER et al. 1996; REBOUL et al. 1996). Aufgrund der starken Kollagenaseaktivität und der Fähigkeit auch diverse andere Bestandteile der EZM wie Aggrecan, Gelatin und Perlecan abzubauen (WANG et al. 2011) eröffnet MMP 13 Zellen aber auch Möglichkeiten zur proteolytischen Fortbewegung. Es ist bekannt, dass die MMP eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen im Rahmen von sowohl neoplastischen als auch nicht neoplastischen Erkrankungen spielen (SHIOMI et al. 2010; FRIEDL und WOLF 2010; WOLF und FRIEDL 2009). Somit könnte die gleichbleibende Expression Ausdruck des migratorischen Potentials der CPC sein, wie es auch SEOL et al. (2012) bei ihrer CPC-Population gefunden haben.

In den Fällen von Aggrecan und ADMATS 5 zeigen sich interindividuelle Unterschiede, jedoch verändern sich beide innerhalb der einzelnen Populationen gleichsinnig. Die Schwankungen der Expressionsraten waren bei beiden Genen eher mäßig ausgeprägt. Im Gegensatz hierzu konnte an Chondrozyten eine deutliche Abnahme der Aggrecanexpression um ca. den Faktor 10 durch die 2D-Kultivierung *in vitro* beobachtet werden (ONO et al. 2013; HARDINGHAM T et al. 2002). Auch in den Versuchen mit chondrogen differenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen kam es zu einer Reduktion der Aggrecanlevel auf mRNA-Ebene um ca. das Zehnfache (DIEKMAN et al. 2012). Die Expression von Sox 9 war in den ersten beiden Passagen in drei von vier Fällen gleichbleibend oder moderat vermindert zu den CPC aus Passage 0, in Passage 3 war sie dann in 2 Fällen auf etwas weniger als die Hälfte gesunken. Eine vergleichbare Entwicklung nahm die Expression von Sox 9 in der Studie mit induzierten pluripotenten Stammzellen, da auch hier die Level über 2 Passagen eher konstant blieben und dann um ca. das Zweifache sanken (DIEKMAN et al. 2012). Die Verminderung von Sox 9 durch die Kulturbedingungen ist auch für Chondrozyten belegt, wobei sie hier früher einsetzt und stärker ausgeprägt ist (ONO et al. 2013; TAKAHASHI et al. 2010; HARDINGHAM T et al. 2002). Im Fall von Runx 2 zeigte sich ebenfalls über den Beobachtungszeitraum bei

drei Fällen ein gleichbleibendes bzw. mäßig vermindertes Niveau. In einer Population war von P1 an ein progredienter Anstieg des Runx 2-Level zu verzeichnen.

Insgesamt zeigen die CPC Veränderungen der Expression der ausgewählten Markergene während der In-vitro-Kultivierung wie sie auch an Chondrozyten oder chondrogen differenzierten Stammzellen gefunden werden. Jedoch lassen sich im Gegensatz zur Dedifferenzierung von Chondrozyten an den CPC meist nur moderate Veränderungen der Expression der einzelnen Markergene, d. h. ein *fold change* von weniger als dem Zweifachen, feststellen. Die gegenüber Chondrozyten geringeren Veränderungen, könnten darauf beruhen, dass die CPC in ihrem Expressionsmuster der Markergene bereits eher dedifferenzierten Chondrozyten ähneln. Das in der CPC-Population aus Fall 2 deutlich ausgeprägtere Veränderungen des Genexpressionsmusters festgestellt wurden, könnte daher darauf beruhen, dass diese CPC im Vergleich zu den anderen Fällen schon weiter chondrogen differenziert waren. Die Ergebnisse deuten anhand von ausgewählten Markergenen darauf hin, dass die Kultivierung von CPC unter zweidimensionalen Bedingungen *in vitro* die Zellen während der ersten drei Passagen kaum verändert und wenn, nur zu geringen Expressionsunterschieden führt. Diese Ergebnisse eröffnen eine mögliche therapeutische Nutzung der CPC in Zukunft, da sie zeigen, dass CPC ohne deutliche Beeinflussung der Differenzierungsrichtung mit einfachen Methoden *in vitro* kultiviert werden können. Dies ist von Bedeutung, da so eine große Anzahl an Zellen erreicht werden könnte, indem nur geringe Knorpelvolumina von Patienten, z. B. als Probenentnahme im Rahmen einer Arthroskopie, gewonnen werden müssten. Die relativ breiten 95 %-Konfidenzintervalle der mittleren relativen Expressionsunterschiede zeigen, dass weitere Untersuchungen des Genexpressionsmusters mit größeren Fallzahlen in Zukunft notwendig sind um mit größerer Präzision die wahrscheinlich nur geringen Veränderungen der Expressionsraten beurteilen zu können.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die humanen chondrogenen Progenitorzellen (CPC) auf ihre Eignung für einen möglichen Therapieansatz der Osteoarthritis (OA). Hierbei zeigte sich, dass die CPC die Fähigkeit zur Migration sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* besitzen. *In vitro* steigerte der Einsatz von TGF- β 3 die Migrationsrate, was von therapeutischem Nutzen sein könnte. Die CPC wanderten *ex vivo* ebenso in Knorpelgewebe aus makroskopisch unauffälligen Bereichen wie in an den Hauptdefekt angrenzendes Gewebe ein. Mit der Versuchsdauer nahm die Einwanderungstiefe zu, wobei dies im unauffällig erscheinenden Knorpel ausgeprägter war und hier auch größere Eindringtiefen gemessen wurden. Dies spricht für eine Zielzone, die die CPC anstreben und die im Knorpel neben dem Hauptdefekt früher erreicht wird. Bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit weisen die CPC eine Heterogenität auf, verglichen mit anderen Zelltypen im menschlichen Organismus ist sie insgesamt allerdings gering. Über die gesamte Versuchsdauer ließen sich in beiden Gewebetypen proliferationsfähige CPC nachweisen. Eine Genexpressionsanalyse zeigte, dass die CPC dedifferenzierten Chondrozyten am ähnlichsten sind und eine kurzfristige Kultivierung sie kaum beeinflusst. Die Transfektion veränderte die Ausrichtung der CPC nicht, sondern führte vornehmlich zu einer vorübergehenden generellen Herabregulierung der Genexpression. Die Ergebnisse zeigen, dass ein therapeutischer Einsatz der CPC möglich wäre, da die Zellen auf einfache und komplikationsarme Weise gewonnen und kultiviert werden können. Zudem eröffnen die ausgeprägten migratorischen Fähigkeiten der CPC einfache Applikationswege, z. B. im Rahmen einer intraartikulären Injektion oder Arthroskopie. Ebenso viel versprechend ist die Erkenntnis, dass die Zellen innerhalb des Gewebes vital bleiben und so an einer Regeneration teilhaben könnten. Vor einer zukünftigen Anwendung der CPC bleiben allerdings noch einige Fragen zu beantworten. So ist die Rolle der CPC in der Pathogenese der OA noch nicht vollständig geklärt. Außerdem bleibt offen, wie lange die CPC im Gewebe

vital bleiben und ob sie in der Lage sind, im Gewebe hyaline Knorpel-EZM herzustellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben daher Anlass für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

6. Literaturverzeichnis

Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, Toda K (2006):

Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration.

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 14, 1307-1314

Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E (2006):

Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis.

Arthritis Rheum 54, 3533-3544

Aigner T, Haag J, Martin J, Buckwalter J (2007):

Osteoarthritis: aging of matrix and cells--going for a remedy.

Curr Drug Targets 8, 325-331

Altman RD (2010):

Early management of osteoarthritis.

Am J Manag Care 16, S41-S47

Arner EC (2002):

Aggrecanase-mediated cartilage degradation.

Curr Opin Pharmacol 2, 322-329

Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM et al. (2004):

[Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)].

Z Orthop Ihre Grenzgeb 142, 529-539

Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G (2006):

Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee.

Cochrane Database Syst Rev 2, CD005321

Benninghoff A (1925):

Form und Bau der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil .

Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion.

Z Zellforsch Mik Ana 2, 783-862

Benya PD, Shaffer JD (1982):

Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.

Cell 30, 215-224

Blum B, Benvenisty N (2007):

Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas.

Stem Cells 25, 1924-1930

Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N (2001):

The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage 9, 654-663

Borzi RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A. (2004):

Chemokines in cartilage degradation.

Clin Orthop Relat Res 427, S53-S61

Bos PK, Kops N, Verhaar JA, van Osch GJ (2008):

Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment.

Osteoarthritis Cartilage 16, 204-211

Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L (2006):

Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease.

Ann Rheum Dis 65, 1261-1264

Brittberg M:

Failed articular cartilage repair: What to do?

in: Current concepts in cartilage repair; hrsg. v. Brittberg M, Imhoff A, Madry H, Mandelbaum B;

DJO Publications, Guildford, UK 2010, 165-172

Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A (2003):

Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments.

J Bone Joint Surg Am 85-A, 109-115

Broom ND, Myers DB (1980):

A study of the structural response of wet hyaline cartilage to various loading situations.

Connect Tissue Res 7, 227-237

Buckland-Wright C (2004):

Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography.

Osteoarthritis Cartilage 12, S10-S19

Buckley CT, Meyer EG, Kelly DJ (2012):

The influence of construct scale on the composition and functional properties of cartilaginous tissues engineered using bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Tissue Eng Part A 18, 382-396

Buckwalter JA (1995):

Should bone, soft-tissue, and joint injuries be treated with rest or activity?

J Orthop Res 13, 155-156

Buckwalter JA, Lane NE (1996):

Aging, Sports, and Osteoarthritis

Sports Med and Arthrosc Rev 4, 276-287

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998a):

Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.

Instr Course Lect 47, 477-486

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998b):

Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.

Instr Course Lect 47, 487-504

Buckwalter JA, Kuettner KE, Thonar EJ (1985):

Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: electron microscopic studies.

J Orthop Res 3, 251-257

Buckwalter JA, Hunziker EB, Rosenberg LC, Coutts RD, Adams ME, Eyre DR:

Articular cartilage. Composition and structure.

in: Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissue; hrsg. v. Woo S L-Y,

Buckwalter JA;

The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Illinois 1988, 405-425

Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR (1993):

Soft-tissue aging and musculoskeletal function.

J Bone Joint Surg Am 75, 1533-1548

Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC (1994a):

Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies.

Microsc Res Tech 28, 398-408

- Buckwalter JA, Pita JC, Muller FJ, Nessler J (1994b):
Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates.
J Orthop Res 12, 144-148
- Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ (2000):
Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis.
Instr Course Lect 49, 481-489
- Burr DB (2004):
Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis.
Osteoarthritis Cartilage 12, S20-S30
- Burr DB, Schaffler MB (1997):
The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence.
Microsc Res Tech 37, 343-357
- Calandruccio RA, Gilmer WS Jr (1962):
Proliferation, Regeneration, and Repair of Articular Cartilage of Immature Animals
J Bone Joint Surg Am 44, 431-455
- Carrington JL (2005):
Aging bone and cartilage: cross-cutting issues.
Biochem Biophys Res Commun 328, 700-708
- Cawston TE, Wilson AJ (2006):
Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease.
Best Pract Res Clin Rheumatol 20, 983-1002
- Chang C, Lauffenburger DA, Morales TI (2003):
Motile chondrocytes from newborn calf: migration properties and synthesis of collagen II.
Osteoarthritis Cartilage 11, 603-612
- Chomchalao P, Pongcharoen S, Sutheerawattananonda M, Tiyaboonchai W (2013):
Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture.
Biomed Eng Online 12, 28
- Dealy CN (2012):
Chondrogenic Progenitors for Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment.
Rheumatology S3, e001

- De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP (2004):
Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo.
Arthritis Rheum 50, 142-150
- Deschner J, Hofman CR, Piesco NP, Agarwal S (2003):
Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes.
Curr Opin Clin Nutr Metab Care 6, 289-293
- Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F (2010):
Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix.
Tissue Eng Part A 16, 523-533
- Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, Sun H, Sanchez-Adams J, Leong KW, Guilak F (2012):
Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 109, 19172-19177
- Dudhia J (2005):
Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage.
Cell Mol Life Sci 62, 2241-2256
- English A, Jones EA, Corscadden D, Henshaw K, Chapman T, Emery P, McGonagle D (2007):
A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis.
Rheumatology (Oxford) 46, 1676-1683
- Estes BT, Wu AW, Guilak F (2006):
Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6.
Arthritis Rheum 54, 1222-1232
- Eyre DR, Wu J-J, Woods P:
Cartilage-specific collagens: Structural studies.
in: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JC, Hascall VC;
Raven Press, New York 1992, 119-131
- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ (2006):
Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?
Eur Cell Mater 12, 57-63

- Fanning PJ, Emkey G, Smith RJ, Grodzinsky AJ, Szasz N, Trippel SB (2003):
Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage.
J Biol Chem 278, 50940-50948
- Felson DT (2006):
Clinical practice. Osteoarthritis of the knee.
N Engl J Med 354, 841-848
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998):
Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.
Science 279, 1528-1530
- Fitzgerald JB, Jin M, Dean D, Wood DJ, Zheng MH, Grodzinsky AJ (2004):
Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP.
J Biol Chem 279, 19502-19511
- Frenkel SR, Clancy RM, Ricci JL, Di Cesare PE, Rediske JJ, Abramson SB (1996):
Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly.
Arthritis Rheum 39, 1905-1912
- Friedl P, Bröcker EB (2000):
The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix.
Cell Mol Life Sci 57, 41-64
- Friedl P, Wolf K (2010):
Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model.
J Cell Biol 188, 11-19
- Friedl P, Zänker KS, Bröcker EB (1998):
Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function.
Microsc Res Tech 43, 369-378
- Fuchs E (2008):
Skin stem cells: rising to the surface.
J Cell Biol 180, 273-284.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004):
Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.
Cell 116, 769-778

Gallagher JT (1989):

The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone.
Curr Opin Cell Biol 1, 1201-1218

Gay S, Müller PK, Lemmen C, Remberger K, Matzen K, Kühn K (1976):

Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and
degenerative osteoarthritis.
Klin Wochenschr 54, 969-976

Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Bag S, Sadick H, Klüter H, Hörmann K, Riedel F
(2006a):

[A comparison of the gene expression patterns of human chondrocytes and
chondrogen differentiated mesenchymal stem cells for tissue engineering].
HNO 54, 258-266

Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K, Riedel F (2006b):

In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors
in cultured human chondrocytes.
Otolaryngol Head Neck Surg 134, 510-515

Goldring MB, Goldring SR (2007):

Osteoarthritis.
J Cell Physiol 213, 626-634

Goldring MB, Marcu KB (2009):

Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases.
Arthritis Res Ther 11, 224

Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T (2010):

Surgical management of articular cartilage defects of the knee.
J Bone Joint Surg Am. 92, 2470-2490

Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC (1988):

Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic
response.
J Orthop Res 6, 777-792

Grodzinsky AJ:

Age-related changes in cartilage: Physical properties and cellular response to
loading.

in: Musculoskeletal Soft-Tissue Aging: Impact on Mobility; hrsg. v. Buckwalter JA,
Goldberg V, Woo S.L.-Y

The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont Illinois 1993, 137-149

- Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK (2009):
Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis.
Arthritis Res Ther 11, R85
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003):
Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.
J Cell Sci 116, 1827-1835
- Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M (1995):
Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development.
Arthritis Rheum 38, 960-968
- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB (2004):
The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair.
Clin Orthop Relat Res 423, 17-26
- Hardingham T (1981):
Proteoglycans: their structure, interactions and molecular organization in cartilage.
Biochem Soc Trans 9, 489-497
- Hardingham T (1993):
Control of cartilage matrix synthesis by chondrocytes.
Osteoarthritis Cart 1, 4
- Hardingham T, Tew S, Murdoch A (2002):
Tissue engineering: chondrocytes and cartilage.
Arthritis Res 4, S63-S68
- Hardingham TE, Muir H (1972):
The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans.
Biochim Biophys Acta 279, 401-405
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992):
Proteoglycans: many forms and many functions.
FASEB J 6, 861-870
- Hardingham TE, Perkins SJ, Muir H (1983):
Molecular conformations in proteoglycan aggregation.
Biochem Soc Trans 11, 128-130

- Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J:
Aggrecan, the chondroitin sulfate / keratan sulfate proteoglycan from cartilage.
in: Articular Cartilage and Osteoarthritis; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R,
Peyron JG, Hascall VC
Raven Press, New York 1992, 5-20
- Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC (2010):
Autologous chondrocyte implantation: a systematic review.
J Bone Joint Surg Am 92, 2220-2233
- Hascall VC (1977):
Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid.
J Supramol Struct 7, 101-120
- Hascall VC, Sajdera SW (1969):
Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. The function of
glycoprotein in the formation of aggregates.
J Biol Chem 244, 2384-2396
- Hascall VC, Heinegård D (1974):
Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid.
J Biol Chem 249, 4232-4241
- Heinegård DK, Pimentel ER:
Cartilage matrix proteins.
in: Articular Cartilage and Osteoarthritis; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R,
Peyron JG, Hascall VC
Raven Press, New York 1992, 95-111
- Heinegård DK, Lorenzo P, Sommarin Y:
Articular cartilage matrix proteins.
in: Osteoarthritic Disorders; hrsg. v. Kuettner KE, Goldberg VM
The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont Illinois 1995, 229-237
- Helen W, Gough JE (2008):
Cell viability, proliferation and extracellular matrix production of human annulus
fibrosus cells cultured within PDLLA/Bioglass composite foam scaffolds in vitro.
Acta Biomater 4, 230-243
- Hill CL, Gale DG, Chaisson CE, Skinner K, Kazis L, Gale ME, Felson DT (2001):
Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain
in osteoarthritis.
J Rheumatol 28, 1330-1337

- Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR (1994):
Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by
a new immunoassay.
J Clin Invest 93, 1722-1732
- Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR (1995):
Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface,
originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive
degeneration.
J Clin Invest 96, 2859-2869
- Horton WE Jr, Yagi R, Lavery D, Weiner S (2005):
Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced
osteoarthritic cartilage.
Clin Exp Rheumatol 23, 103-112
- Johnson LL (1986):
Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present
status.
Arthroscopy 2, 54-69
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998):
In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.
Exp Cell Res 238, 265-272
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D (2004):
Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential
mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis.
Arthritis Rheum 50, 817-827
- Kassem M, Abdallah BM. (2008):
Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and
potential role in therapy of degenerative diseases.
Cell Tissue Res 331, 157-163
- Kazis LE, Meenan RF, Anderson JJ (1983):
Pain in the rheumatic diseases. Investigation of a key health status component.
Arthritis Rheum 26, 1017-1022
- Kempson GE:
Mechanical properties of articular cartilage.
in: Adult articular cartilage, 2nd edition; hrsg. v. Freeman M
Pitman Medical, Tunbridge Wells 1979, 333-414

- Khan WS, Adesida AB, Hardingham TE (2007):
Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2alpha and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients.
Arthritis Res Ther 9, R55
- Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996):
Biochemical characterization of human collagenase-3.
J Biol Chem 271, 1544-1550
- Knobloch TJ, Madhavan S, Nam J, Agarwal S Jr, Agarwal S (2008):
Regulation of chondrocytic gene expression by biomechanical signals.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr 18, 139-150
- Koelling S, Miosge N (2009):
Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis.
Expert Opin Biol Ther 9, 1399-1405
- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009):
Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis.
Cell Stem Cell 4, 324-335
- Koepf H, Eger W, Muehleman C, Valdellon A, Buckwalter JA, Kuettner KE, Cole AA (1999):
Prevalence of articular cartilage degeneration in the ankle and knee joints of human organ donors.
J Orthop Sci 4, 407-412
- Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, Hardingham TE (2001):
Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor.
Rheumatology (Oxford) 40, 1146-1156
- Kouri JB, Jiménez SA, Quintero M, Chico A (1996):
Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage.
Osteoarthritis Cartilage 4, 111-125
- Kruegel J, Miosge N, Koelling S (2008):
The Role of Progenitor Cells in Osteoarthritis.
Current Rheumatology Reviews 4, 210-213
- Lane LB, Villacin A, Bullough PG (1977):
The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon.
J Bone Joint Surg Br 59, 272-278

- Lee CH, Cook JL, Mendelson A, Moioli EK, Yao H, Mao JJ (2010):
Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study.
Lancet 376, 440-448
- Loeser RF (2006):
Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide.
Arthritis Rheum 54, 1357-1360
- Lohmander LS, Roos EM (2007):
Clinical update: treating osteoarthritis.
Lancet 370, 2082-2084
- Lützner J, Kasten P, Günther KP, Kirschner S (2009):
Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee.
Nat Rev Rheumatol 5, 309-316
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998):
Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.
Tissue Eng 4, 415-428
- Madry H:
Operative und rekonstruktive Behandlung.
in: Orthopädie und orthopädische Chirurgie: Knie: 67 Tabellen; hrsg. v. Kohn D
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 367-379
- Madry H, Pape D (2008):
[Autologous chondrocyte transplantation].
Orthopäde 37, 756-763
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010):
The basic science of the subchondral bone.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 18, 419-433
- Madry H, Grün UW, Knutsen G (2011):
Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options.
Dtsch Arztebl Int 108, 669-677
- Makhijani NS, Bischoff DS, Yamaguchi DT (2005):
Regulation of proliferation and migration in retinoic acid treated C3H10T1/2 cells by TGF-beta isoforms.
J Cell Physiol 202, 304-313

- Maniwa S, Ochi M, Motomura T, Nishikori T, Chen J, Naora H (2001):
Effects of hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor on motility of chondrocytes and synovial cells in culture.
Acta Orthop Scand 72, 299-303
- Mankin HJ (1963):
Localization of Tritiated Thymidine in Articular Cartilage of Rabbits III. MATURE ARTICULAR CARTILAGE
J Bone Joint Surg Am 45, 529-540
- Maroudas A:
Physicochemical properties of articular cartilage.
in: *Adult articular cartilage*, 2nd edition; hrsg. v. Freeman M
Pitman Medical, Tunbridge Wells 1979, 215-290
- Maroudas A, Bannan C (1981):
Measurement of swelling pressure in cartilage and comparison with the osmotic pressure of constituent proteoglycans.
Biorheology 18, 619-632
- Maroudas A, Bayliss M, Brocklehurst B, Coysh L, Freeman M, Revell P, Venn M (1983):
[Biochemical and physico-chemical studies on osteoarthritis in relation to some clinical aspects].
Orthopade 12, 109-118
- Martin JA, Buckwalter JA (1996a):
Articular cartilage aging and degeneration.
Sports Med and Arthrosc Rev 4, 263-275
- Martin JA, Buckwalter JA (1996b):
Fibronectin and cell shape affect age-related decline in chondrocyte synthetic response to IGF-I.
Trans Orthop Res Soc 21, 306
- Martin JA, Buckwalter JA (2002):
Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis.
Biogerontology 3, 257-264
- Meachim G, Stockwell RA:
The matrix.
in: *Adult articular cartilage*, 2nd edition; hrsg. v. Freeman M
Pitman Medical, London 1979, 1-67
- Mellott AJ, Forrest ML, Detamore MS (2013):
Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering.
Ann Biomed Eng 41, 446-468

Miller EJ:

The collagen of joints.

in: The joints and synovial fluid. Vol I; hrsg. v. Sokoloff L

Academic Press, New York 1978, 205-224

Millward-Sadler SJ, Salter DM (2004):

Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction.

Ann Biomed Eng 32, 435-446

Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T (2009):

Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques.

Am J Sports Med 37, 902-908

Miosge N, Waletzko K, Bode C, Quondamatteo F, Schultz W, Herken R (1998):

Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage 6, 278-285

Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004):

Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis.

Histochem Cell Biol 122, 229-236

Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR (2009):

Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis.

Am J Sports Med 37, 2053-2063

Mokbel AN, El Tookhy OS, Shamaa AA, Rashed LA, Sabry D, El Sayed AM (2011):

Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model.

BMC Musculoskelet Disord 12, 259

Morales TI (2007):

Chondrocyte moves: clever strategies?

Osteoarthritis Cartilage 15, 861-871

Moseley JB Jr, Anderson AF, Browne JE, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C (2010):

Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients.

Am J Sports Med 38, 238-246

Mow VC, Rosenwasser MP:

Articular cartilage: Biomechanics.

in: Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft-Tissue; hrsg. v. Woo S L-Y,
Buckwalter JA

The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge Illinois 1988, 427-463

Müller FJ, Pita JC, Manicourt DH, Malinin TI, Schoonbeck JM, Mow VC (1989):

Centrifugal characterization of proteoglycans from various depth layers and weight-bearing areas of normal and abnormal human articular cartilage.

J Orthop Res 7, 326-334

Muir H:

Biochemistry.

in: Adult articular cartilage, 2nd edition; hrsg. v. Freeman M

Pitman Medical, London 1979, 145-214

Muir H (1995):

The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.

Bioessays 17, 1039-1048

Murphy G, Nagase H (2008):

Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?

Nat Clin Pract Rheumatol 4, 128-135

Myers ER, Mow VC:

Biomechanics of cartilage and its response to biomechanical stimuli.

in: Cartilage vol 1: Structure, function and biochemistry; hrsg. v. Hall BK

Academic Press, New York 1983, 313-341

Niemeyer P, Köstler W, Salzmann GM, Lenz P, Kreuz PC, Südkamp NP (2010):

Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal cartilage defects in patients age 40 years and older: A matched-pair analysis with 2-year follow-up.

Am J Sports Med 38, 2410-2416

Nobelprize.org. (2013):

"Kary B. Mullis - Facts". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web. 21 Feb 2014.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html

(zuletzt eingesehen am 21.02.2014)

Noyes FR, Stabler CL (1989):

A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy.

Am J Sports Med 17, 505-513

Ono Y, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Omachi T, Nakashima M, Ishizuka S, Matsukawa T, Knudson W, Knudson CB et al. (2013):

Chondrogenic capacity and alterations in hyaluronan synthesis of cultured human osteoarthritic chondrocytes.

Biochem Biophys Res Commun 435, 733-739

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ (1995):

Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 92, 4857-4861

Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ (1998):

Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1142-1147

Pfaffl MW (2001):

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res 29, e45

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002):

Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.

Nucleic Acids Res 30, e36

Pi X, Ren R, Kelley R, Zhang C, Moser M, Bohil AB, Divito M, Cheney RE, Patterson C (2007):

Sequential roles for myosin-X in BMP6-dependent filopodial extension, migration, and activation of BMP receptors.

J Cell Biol 179, 1569-1582

Pita JC, Manicourt DH, Müller FJ (1990):

Centrifugal and biochemical comparison of two populations of proteoglycan aggregates from articular cartilage of immobilized dog joints.

Trans Orthop Res Soc 15, 17

Pita JC, Müller FJ, Manicourt DH, Buckwalter JA, Ratcliff A:

Early matrix changes in experimental osteoarthritis and joint disuse atrophy.

in: Articular Cartilage and Osteoarthritis; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC

Raven Press, New York 1992, 455-469

- Plaas A, Osborn B, Yoshihara Y, Bai Y, Bloom T, Nelson F, Mikecz K, Sandy JD (2007):
Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical
characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages.
Osteoarthritis Cartilage 15, 719-734
- Poole AR (1983):
Complexity of proteoglycan organization in articular cartilage: recent observations.
J Rheumatol Suppl 11, 70-75
- Poole AR (1999):
An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis.
Front Biosci 4, D662-D670
- Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ (1996):
Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and
osteoarthritic human articular cartilage.
J Orthop Res 14, 681-689
- Poole AR, Guilak F, Abramson SB:
Etiopathogenesis of osteoarthritis.
in: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical / surgical management*. 4th edition; hrsg. v.
Moskowitz RW, Altman RW, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM
Williams and Wilkins, Lippincott Philadelphia 2007, 27-49
- Poole CA (1997):
Articular cartilage chondrons: form, function and failure.
J Anat 191, 1-13
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1984):
Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices.
J Anat 138, 113-138
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1987):
Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment
in adult human articular cartilages.
J Orthop Res 5, 509-522
- Poole CA, Ayad S, Schofield JR (1988a):
Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the
pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons.
J Cell Sci 90, 635-643
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1988b):
Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation
and structure.
J Orthop Res 6, 408-419

- Poole CA, Wotton SF, Duance VC (1988c):
Localization of type IX collagen in chondrons isolated from porcine articular cartilage and rat chondrosarcoma.
Histochem J 20, 567-574
- Poole CA, Glant TT, Schofield JR (1991):
Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons.
J Histochem Cytochem 39, 1175-1187
- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT (1992):
Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy.
J Cell Sci 103, 1101-1110
- Poole CA, Gilbert RT, Herbage D, Hartmann DJ (1997):
Immunolocalization of type IX collagen in normal and spontaneously osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons.
Osteoarthritis Cartilage 5, 191-204
- Pridie KH (1955):
The development and nature of osteoarthritis of the hip joint.
Rheumatism 11, 2-7
- Pridie KH (1959):
A Method of Resurfacing Knee Joints.
J Bone Joint Surg Br 41-B, 618-619
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006):
Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.
Osteoarthritis Cartilage 14, 13-29
- Prockop DJ (2009):
Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms.
Mol Ther 17, 939-946
- Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG (2010):
Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue
Tissue Eng Part B Rev 16, 435-444

- Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF (2005):
NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by
human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments.
J Immunol 174, 5781-5788
- Ratcliffe A, Mow VC:
Articular Cartilage.
in: Extracellular Matrix. Vol. 1. Tissue Function; hrsg. v. Comper WD
Harwood Academic Publishers, The Netherlands 1996, 234-302
- Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1996):
The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human
chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis.
J Clin Invest 97, 2011-2019
- Reginster JY (2002):
The prevalence and burden of arthritis.
Rheumatology (Oxford) 41, 3-6
- Rengel Y, Ospelt C, Gay S (2007):
Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction.
Arthritis Res Ther 9, 221
- REST 2009 Software User Guide (2009):
<http://rest-2009.gene-quantification.info>
(zuletzt eingesehen am 24.02.2014)
- Roos EM (2005):
Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults.
Curr Opin Rheumatol 17, 195-200
- Rosenberg LC:
Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage.
in: Articular Cartilage and Osteoarthritis; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R,
Peyron JC, Hascall VC
Raven Press, New York 1992, 45-62
- Rosenberg LC, Buckwalter JA:
Cartilage proteoglycans.
in: Articular Cartilage Biochemistry; hrsg. v. Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall
VC
Raven Press, New York 1986, 39-57

Roth V, Mow VC (1980):

The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age.

J Bone Joint Surg Am 62, 1102-1117

Roughley PJ, Lee ER (1994):

Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.

Microsc Res Tech 28, 385-397

Sandell LJ, Aigner T (2001):

Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis.

Arthritis Res 3, 107-113

Sandell LJ, Chansky H, Zaniparo O, Hering TM:

Molecular biology of cartilage proteoglycans and link protein.

in: Osteoarthritic Disorders; hrsg. v. Kuettner KE, Goldberg VM

The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont Illinois 1995, 117-130

Sandy JD (2006):

A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis.

Osteoarthritis Cartilage 14, 95-100

Santer V, White RJ, Roughley PJ (1982):

O-Linked oligosaccharides of human articular cartilage proteoglycan.

Biochim Biophys Acta 716, 277-282

Schmidt S, Friedl P (2010):

Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms.

Cell Tissue Res 339, 83-92

Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ (2001):

BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells.

Biochem Biophys Res Commun 284, 411-418

Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA et al. (2012):

Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury.

Arthritis Rheum 64, 3626-3637

Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y (2010):

Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases.

Pathol Int 60, 477-496

- Simon TM, Jackson DW (2006):
Articular cartilage: injury pathways and treatment options.
Sports Med Arthrosc 14, 146-154
- Spees JL, Whitney MJ, Sullivan DE, Lasky JA, Laboy M, Ylostalo J, Prockop DJ (2008):
Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension.
FASEB J 22, 1226-1236
- Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001):
Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects.
Clin Orthop Relat Res 391 Suppl, S362-S369
- Steinmeyer J, Kontinen YT (2006):
Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future.
Adv Drug Deliv Rev 58, 168-211
- Stockwell RA:
Biology of Cartilage Cells.
Cambridge University Press, Cambridge 1979
- Stockwell RA:
Metabolism of Cartilage.
in: *Cartilage*, vol. 1. Structure, function and biochemistry; hrsg. v. Hall BK
Academic Press, New York 1983, 253-280
- Stockwell RA, Billingham ME, Muir H (1983):
Ultrastructural changes in articular cartilage after experimental section of the anterior cruciate ligament of the dog knee.
J Anat 136, 425-439
- Sulzbacher I (2000):
[Arthrosis--histology and pathogenetic approaches].
Radiologe 40, 1126-1133
- Takahashi N, Knudson CB, Thankamony S, Ariyoshi W, Mellor L, Im HJ, Knudson W (2010):
Induction of CD44 cleavage in articular chondrocytes.
Arthritis Rheum 62, 1338-1348
- Tesche F, Miosge N (2005):
New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease.
Histol Histopathol 20, 329-337

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998):
Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Science 282, 1145-1147
- Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003):
Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.
Arthritis Res Ther 5, 32-45
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002):
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.
Genome Biol 3, RESEARCH0034
- van Baar ME, Dekker J, Lemmens JA, Oostendorp RA, Bijlsma JW. (1998):
Pain and disability in patients with osteoarthritis of hip or knee: the relationship with articular, kinesiological, and psychological characteristics.
J Rheumatol 25, 125-133
- Venn M, Maroudas A (1977):
Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition.
Ann Rheum Dis 36, 121-129
- Vinardell T, Buckley CT, Thorpe SD, Kelly DJ (2011):
Composition-function relations of cartilaginous tissues engineered from chondrocytes and mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and infrapatellar fat pad.
J Tissue Eng Regen Med 5, 673-683
- von der Mark K, Glückert K (1990):
[Biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthroses].
Orthopade 19, 2-15
- Wang M, Shen J, Jin H, Im HJ, Sandy J, Chen D (2011):
Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis.
Ann N Y Acad Sci 1240, 61-69
- Wolf K, Friedl P (2009):
Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces.
Clin Exp Metastasis 26, 289-298

- Woolf AD, Pfleger B (2003):
Burden of major musculoskeletal conditions.
Bull World Health Organ 81, 646-656
- Wotton SF, Duance VC, Fryer PR (1988):
Type IX collagen: a possible function in articular cartilage.
FEBS Lett 234, 79-82
- Wotton SF, Jeacocke RE, Maciewicz RA, Wardale RJ, Duance VC (1991):
The application of scanning confocal microscopy in cartilage research.
Histochem J 23, 328-335
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR (1992):
Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding.
J Biol Chem 267, 23007-23014
- Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M et al. (2010):
OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009.
Osteoarthritis Cartilage 18, 476-499
- Zhao YH, Yang Q, Xia Q, Peng J, Lu SB, Guo QY, Ma XL, Xu BS, Hu YC, Zhao B et al. (2013):
In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Chin Med J (Engl) 126, 3130-3137
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006):
Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis.
Proc Natl Acad Sci U S A 103, 19004-19009
- Zhou Y, Millward-Sadler SJ, Lin H, Robinson H, Goldring M, Salter DM, Nuki G (2007):
Evidence for JNK-dependent up-regulation of proteoglycan synthesis and for activation of JNK1 following cyclical mechanical stimulation in a human chondrocyte culture model.
Osteoarthritis Cartilage 15, 884-893

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau C. Bode und Frau B. Sadowski, die mir mit großer Freude und nicht minder großer Geduld beim Erlernen der verschiedenen Methoden für die Arbeit im Labor zur Seite standen.

Meinen Mitdoktoranden und allen Mitarbeitern der AG Orale Biologie und Geweberegeneration danke ich für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und immer gute Zusammenarbeit.