
Einflüsse einer Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose auf humane artikuläre Chondrozyten

Nele Pascale Grigull



München 2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und
Rehabilitation

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Volkmar Jansson

***Einflüsse einer Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose
auf humane artikuläre Chondrozyten***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nele Pascale Grigull

aus
Filderstadt

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Susanne Mayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Elias Volkmer
Priv. Doz. Dr. Manfred Pfahler
Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2021

Abstract

Arthrose ist eine weltweit häufige degenerative Erkrankung, die neben gravierenden Lebensqualitätseinschränkungen der Betroffenen auch zu erheblichen sozioökonomischen Belastungen führt. Bisher kann Arthrose nicht *ad integrum* geheilt werden. Zellbasierte Therapieansätze sind auf eine gute Qualität der Knorpelkonstrukte angewiesen. Ein dabei noch ungelöstes Problem ist die *in vitro* Dedifferenzierung der Chondrozyten. Den Goldstandard zum Erhalt der chondrogenen Differenzierung bildet die Pelletkultur. Hierbei könnten Hydrogele aus bakterieller Zellulose (BC) aufgrund ihrer biomimetischen Eigenschaften eine attraktive Alternative darstellen.

Die Hypothese war, dass humane artikuläre Chondrozyten in Kultur in hoher Zelldichte (HD Kultur) von einer Kultivierung auf einem BC Hydrogel profitieren würden. Außerdem sollte auf die Frage eingegangen werden, ob sich arthrotische (OA) und nicht arthrotische (non-OA) Chondrozyten in ihrer Reaktion auf Redifferenzierungsstimuli unterscheiden.

Dazu wurden OA und non-OA Chondrozyten in Passage 2-4 nach siebentägiger Kultivierung als HD Kultur auf BC Hydrogel auf ihre Genexpression auf mRNA Ebene analysiert sowie eine histologische Beurteilung durchgeführt. Hierbei dienten eine HD Kultur auf Polystyrol und eine Pelletkultur als Kontrollgruppen.

Insgesamt exprimierten die Chondrozyten in allen unterschiedlichen Kulturformen das Hauptgen der chondrogenen Differenzierung *COL2A1*. Es zeigten sich jedoch in der Hydrogelgruppe im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* Erhöhungen. In der Polystyrolgruppe waren im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* und *COL1A1* Erhöhungen zu verzeichnen. Die Chondrozyten in Pelletkultur erreichten in diesem Setting die beste chondrogene Differenzierung mit der signifikant höchsten *COL2A1/COL1A1*-Ratio. OA und non-OA Chondrozyten reagierten sehr ähnlich auf die verschiedenen Kulturformen. Histologisch zeigte sich, dass die Chondrozyten in Pelletkultur einen hochwertigeren Neoknorpel mit mehr EZM bildeten als die Chondrozyten auf Hydrogel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pelletkultur in diesem Setting der HD Kultur auf BC Hydrogel überlegen blieb. Dabei zeigte sich bei OA und non-OA Chondrozyten gleichermaßen die Fähigkeit zur Redifferenzierung.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	13
1.1 Knorpelaufbau	13
1.2 Arthrose	15
1.3 Ansätze zur Knorpel Regeneration	16
1.4 Hydrogel aus bakterieller Zellulose	19
1.5 Kultur in hoher Zelldichte	20
1.6 Pelletkultur	20
1.7 Chondrozyten aus Entnahmegebieten mit oder ohne Arthrose?	20
1.8 Fragestellung	21
1.9 Versuchsansatz	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte und Instrumente	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.2.1 Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose	27
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Fertigsysteme	29
2.1.6 Medien und Medienzusätze	29
2.1.7 Humane Chondrozyten	30
2.1.8 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	31

2.1.9	Histologische Färbungen	31
2.1.10	Software	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	Allgemeine Bemerkungen	32
2.2.2	Zellkultur	33
2.2.2.1	Mediumwechsel.....	33
2.2.2.2	Zellen einfrieren.....	33
2.2.2.3	Zellen auftauen.....	33
2.2.2.4	Passagieren	34
2.2.2.5	Zellzählung	34
2.2.2.6	Chondrozytenisolierung.....	35
2.2.2.7	Kultur in hoher Zelldichte auf Polystyrol	36
2.2.2.8	Kultur in hoher Zelldichte auf Hydrogel.....	37
2.2.2.9	Pelletkultur.....	38
2.2.2.10	Validierung der gewählten Zelldichte	39
2.2.2.11	Versuchsaufbau.....	39
2.2.3	RNA-Extraktion	40
2.2.3.1	Probengewinnung und Zell-Lyse	40
2.2.3.2	Phasentrennung	41
2.2.3.3	Präzipitation.....	41
2.2.3.4	Waschen	42
2.2.3.5	Messen.....	42
2.2.4	c-DNA-Synthese	42
2.2.5	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	44
2.2.6	Auswertung der Genexpressionsanalysen.....	46
2.2.6.1	$2^{-\Delta\Delta CT}$ –Methode	46
2.2.6.2	Statistik.....	47
2.2.7	Histologie	47

2.2.7.1	Probengewinnung	47
2.2.7.2	Gefrierschnitte	48
2.2.7.3	Safranin O/Lichtgrün Färbung	48
2.2.7.4	Fotos	49
2.2.7.5	Histologisches Assessment.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Validierung der gewählten Zelldichte.....	50
3.2	Genexpressionsanalyse	52
3.3	Histologie.....	60
4	Diskussion	63
4.1	Validierung der gewählten Zelldichte.....	64
4.2	Genexpressionsanalyse	64
4.2.1	Einfluss der Pelletkultur	65
4.2.2	Einfluss der Kultur in hoher Zelldichte.....	65
4.2.3	Einfluss der Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose.....	66
4.2.4	Vergleich zwischen OA und non-OA Chondrozyten.....	67
4.2.5	Passage-Effekte.....	68
4.2.6	Kultivierungsdauer	69
4.3	Histologie.....	69
5	Zusammenfassung	71
5.1	Zusammenstellung der Ergebnisse	71
5.2	Beantwortung der Fragestellung.....	71
5.3	Fazit.....	72
	Publikationen	73
	Literaturverzeichnis	74
	Anhang	78
	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphisches Schema zu Ablauf und Auswertung der Versuche.....	23
Abbildung 2: 6-Well Platte BC Hydrogel. In der rechten Spalte sind die ringförmigen Rahmen bestückt mit Hydrogelmembranen aus bakterieller Zellulose, bedeckt mit PBS und mit Folie versiegelt.....	28
Abbildung 3: Schema zum Ausplattieren der Versuche und zur Probengewinnung am Versuchsende.....	36
Abbildung 4: A: 6-Well Platte BC Hydrogel, hier beispielhaft mit Chondrozyten in Kultur. B: Querschnitt eines BC Hydrogel Wells als Schemazeichnung.	37
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Bilder von OA Chondrozyten am dritten Tag der HD Kultur auf Hydrogel (A-C) oder auf Polystyrol (D-F). Passage 2 in A und D, Passage 3 in B und E, Passage 4 in C und F. Die Bilder sind in fünffacher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsbalken messen 200 µm.	38
Abbildung 6: Lichtmikroskopische Bilder von non-OA Chondrozyten am dritten Tag der HD Kultur auf Hydrogel (A-C) oder auf Polystyrol (D-F). Passage 2 in A und D, Passage 3 in B und E, Passage 4 in C und F. Die Bilder sind in fünffacher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsbalken messen 200 µm.	38
Abbildung 7: Zeitlicher Versuchsablauf in der Zellkultur.	40
Abbildung 8: Beispiel zur Verdünnung der RNA auf 1 µg pro Tube. Werte der Spalte E und F sind in µl angegeben.	43
Abbildung 9: Validierungsversuch der gewählten Zelldichte für die HD Kultur. Relative Genexpression von Chondrozyten in Passage 2, normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 nach siebentägiger Kultivierung in niedriger Zelldichte auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. A: <i>COL2A1</i> Expression in OA Chondrozyten; B: <i>COL2A1</i> Expression in non-OA Chondrozyten; C: <i>COL1A1</i> Expression in OA Chondrozyten; D: <i>COL1A1</i> Expression in non-OA Chondrozyten; E: <i>COL2A1/COL1A1</i> -Ratio in OA Chondrozyten; F: <i>COL2A1/COL1A1</i> -Ratio in non-OA Chondrozyten.	51
Abbildung 10: Relative Genexpression von <i>COL2A1</i> normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur.....	53
Abbildung 11: Relative Genexpression von <i>COL1A1</i> normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur.....	54

Abbildung 12: <i>COL2A1/COL1A1</i> -Ratio von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur.....	55
Abbildung 13: Relative Genexpression von <i>ACAN</i> normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur.....	57
Abbildung 14: Relative Genexpression von <i>SOX9</i> normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur.....	58
Abbildung 15: Relative Genexpression von <i>MMP13</i> normalisiert auf <i>GAPDH</i> und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Non-OA Pellet Passage 2 verglichen mit Non-OA Pellet Passage 4: $p = 0,0002$	59
Abbildung 16: Safranin O/Lichtgrün-Färbung von Non-OA Chondrozyten auf Hydrogel (A-C) sowie in Pelletkultur (D-F). Passage 2 in A und D; Passage 3 in B und E; Passage 4 in C und F. Die Maßstabsbalken messen 50 μm in A-C und 100 μm in D-F.	61
Abbildung 17: Safranin O/Lichtgrün-Färbung von OA Chondrozyten auf Hydrogel (A-C) sowie in Pelletkultur (D-F). Passage 2 in A und D; Passage 3 in B und E; Passage 4 in C und F. Die Maßstabsbalken messen 50 μm in A-C und 100 μm in D-F.	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Knorpelprodukte, die bereits in klinischer Verwendung sind, modifiziert nach Huang et al. (17).....	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Instrumente.....	24
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	28
Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme.....	28
Tabelle 6: Liste der verwendeten Fertigsysteme.....	29
Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien und Medienzusätze.....	29
Tabelle 8: Zusammensetzung des Waschmediums.....	29
Tabelle 9: Zusammensetzung des Chondrozytenmediums.....	29
Tabelle 10: Zusammensetzung des Einfriermediums.....	30
Tabelle 11: Charakterisierung der Chondrozyten Spender_innen.....	30
Tabelle 12: Liste der verwendeten Primer.....	31
Tabelle 13: Liste der verwendeten Chemikalien für die histologischen Färbungen. .	31
Tabelle 14: Liste der verwendeten Software.....	32
Tabelle 15: Menge des verwendeten Mediums in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturbehälters.....	33
Tabelle 16: Inhalt des Quanti Tect Reverse Transcription Kit.....	42
Tabelle 17: Komponenten mit Menge pro Probe für den Mastermix der cDNA-Synthese.....	43
Tabelle 18: Programmeinstellung für den Lauf für die reverse Transkription.....	43
Tabelle 19: Programmeinstellungen für die qRT- PCR Läufe.....	44
Tabelle 20: Anlagerungstemperaturen, Amplifikationsdauer und Konzentration der Primer.....	45
Tabelle 21: Pipettierschema für den Mastermix für die qRT-PCR.....	45
Tabelle 22: Färbeschema für die Safranin O/Lichtgrün Färbung.....	48
Tabelle 23: Bern Score eines jeden Kriteriums und in Summe für Hydrogel und Pellets.....	62

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ACAN	Gen des knorpelspezifischen Proteoglykan Kernproteins Aggrecan
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
BC	<i>bacterial cellulose</i> , Bakterielle Zellulose
bzw.	beziehungsweise
COL1A1	Gen der Kollagen I α 1 Kette
COL2A1	Gen der Kollagen II α 1 Kette
COL2A1/ COL1A1- Ratio	Verhältnis der Genexpression von Kollagen II zu Kollagen I
C _T	<i>threshold cycle</i> , erster PCR Zyklus in dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrund Fluoreszenz übersteigt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glukosaminoglykan
GAPDH	Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HD	<i>high density</i> , hohe Zelldichte
HKG	<i>housekeeping gene</i> , internes Referenzgen
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Endothelzellen der Umbilikalvene
ID	Identifikationsnummer
LD	<i>low density</i> , niedrige Zelldichte
MACT	Matrixgestützte autologe Chondrozyten Transplantation
MMP(s)	Metalloproteinase(n)
MMP13	Gen der Matrixmetalloproteinase 13

non-OA	<i>non-osteoarthritic</i> , nicht von Arthrose betroffen
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OA	<i>osteoarthritic</i> , von Arthrose betroffen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
SOX9	Gen des Transkriptionsfaktors SRY-(Geschlechts determinierende Region des Y-Gens) Box 9
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Knorpelaufbau

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein hoch spezialisiertes Stützgewebe im Körper, welches die artikulierenden Gelenkflächen bedeckt und so Reibung bei Bewegung vermindert und die wirkenden Kräfte auf den Knochen verteilt und überträgt (1).

Knorpelgewebe besteht aus Zellen, den Chondrozyten, und der die Zellen umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM). Diese wiederum besteht aus überwiegend Wasser (bis zu 80 % des Nassgewichts (2)), Kollagenen (ca. 60% des Trockengewichts (2)) und Proteoglykanen (20-30 % des Trockengewichts (1)). Außerdem sind Glukosaminoglykane (GAG) und Glykoproteine weitere Bestandteile der EZM, sowie kleinere Strukturproteine (wie z.B. Thrombospondine oder Matrilin) und regulatorische Proteine (1).

Kollagene sind die wichtigsten Stabilität verleihenden Strukturproteine der EZM (2). Kollagen Typ II ist mit 90-95 % das häufigste Kollagen im hyalinen Knorpel (2). Es besteht, wie alle Kollagene, aus drei α Ketten die zu einer Tripelhelix verwunden sind (2). Zu weitaus kleineren Anteilen sind auch Kollagen Typ I, IV, V, VI, IX und XI im hyalinen Knorpel vertreten (2).

Proteoglykane sind hydrophile Proteine, die eine oder mehrere GAG-Seitenketten kovalent an ein Kernprotein gebunden haben und über die GAG-Seitenketten dafür sorgen, dass die EZM Wasser absorbieren und binden kann (1). Der größte Vertreter der Proteoglykane im hyalinen Knorpel ist Aggrecan, des Weiteren kommen unter anderem Versican, Biglycan, Decorin, Perlecan und Lubricin vor (1).

Die EZM reguliert generell das Zellverhalten durch Beeinflussung von Proliferation, Überleben, Form, Migration und Differenzierung der Zellen (3). Gleichzeitig beeinflussen die Zellen auch die EZM durch Änderung der Zusammensetzung, Sekretion und Abbau (3). Im Knorpelgewebe ist eine intakte EZM Voraussetzung für dessen biomechanische Funktion (2). Knorpel kann als biphasisches Medium beschrieben werden, mit Wasser als flüssiger, und der EZM als fester Phase (2). Bei Druckbelastung des Knorpels durch Gelenkbelastung fließt das Wasser aus der EZM; lässt nach der Belastung der Druck wieder nach, wird es durch die hydrophilen EZM Anteile wieder aufgenommen (2). Die Wasserbindekapazität der GAG und die geringe Permeabilität der EZM verhindern dabei ein schnelles Ausströmen des Wassers,

wodurch der Wasserdruck steigt und die festen Matrixbestandteile dadurch entlastet werden (2).

Chondrozyten sind die Zellen des Knorpelgewebes. Sie machen nur etwa 2 % des gesamten Knorpelvolumens aus und stammen von mesenchymalen Stammzellen ab (2). Zu ihren Aufgaben zählt die Bildung und der Erhalt der EZM (2), und den Erhalt der Homöostase im Knorpelgewebe durch Bildung von Enzymen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren (1).

Die wichtigsten Vertreter der EZM abbauenden Enzyme sind die Metalloproteinasen (MMPs) und die Cathepsine (2). Wird das Gleichgewicht zu Gunsten der abbauenden Enzyme gestört, kann dies zu Arthrose führen (2).

Da reifes Knorpelgewebe avaskulär ist, erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und die Chondrozyten betreiben überwiegend anaeroben Stoffwechsel (2).

Neben der Funktion der Chondrozyten und der Zusammensetzung der Matrix ist auch die Gliederung des Knorpelgewebes von entscheidender Bedeutung für dessen biomechanische Funktion. Am Knorpel kann man vier Zonen unterscheiden: die Superficialzone, in der die Chondrozyten spindelförmig parallel zur Oberfläche angeordnet sind, sowie zur Oberfläche parallele Kollagenfasern; die Transitionalzone, in der die Chondrozyten kugelförmig locker verteilt sind, mit quer angeordneten Kollagenfasern und Proteoglykanen; die tiefe Zone, in der die Chondrozyten in Kolonnen angeordnet sind, mit senkrechten Kollagenfasern und dem höchsten Proteoglykangehalt; und die Kalzifizierende Zone mit hypertrophen Chondrozyten, die den Knorpel mit dem Knochen verbindet und die Kollagenfasern im subchondralen Knochen verankert (2). Des Weiteren kann die EZM aufgrund ihrer Zusammensetzung in drei Regionen unterteilt werden: die perizelluläre Matrix umgibt direkt den Chondrozyt, ist reich an Proteoglykanen und wahrscheinlich an der Signaltransduktion beteiligt; die territoriale Matrix formt ein Kollagennetz um den Chondrozyt und schützt diesen wahrscheinlich vor einwirkenden Kräften; und die interterritoriale Matrix, die den größten Teil der Regionen ausmacht, den Hauptteil der biomechanischen Stabilität leistet, und die wie oben beschrieben zonal angeordnet ist (2).

Aufgrund der Avaskularität und da die ausdifferenzierten Chondrozyten nur noch wenig Kapazität haben EZM zu bilden, ist die Fähigkeit zur Selbstheilung und Regeneration im Knorpelgewebe stark eingeschränkt. Dadurch kommt es bei Knorpelverletzungen häufig zur Entstehung von Arthrose (1).

1.2 Arthrose

Arthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung und ist gekennzeichnet durch Knorpelgewebszerstörung, Entzündung der Synovialmembran, Beeinträchtigung der Bänder, Gelenkkapsel und die das Gelenk umgebende Muskulatur sowie durch osteophytäre und subchondrale Knochenneubildung (4, 5).

Arthrose ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung und der häufigste Grund für körperliche Behinderung im Alter (6). Die Lebenszeitprävalenz in Deutschland liegt bei durchschnittlich etwa 20 %, die Prävalenz in der Gruppe der 50-59 Jährigen beträgt 28,7 %, bei den 60-69 Jährigen bereits 40,4 % und bei den 70-79 Jährigen 42,4 % (6). Europaweit sind aktuell mehr als 40 Millionen Menschen von Arthrose betroffen (7). Die Betroffenen erfahren durch Schmerzen sowie durch Bewegungs- und Funktionseinschränkungen in den betroffenen Gelenken teils erhebliche Einschränkungen in ihrer Lebensqualität. Darüber hinaus ist Arthrose durch direkte medizinische Kosten und Kosten aufgrund von Versorgung der Betroffenen und krankheitsbedingten Arbeitsausfällen auch eine sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft (7).

Neben Bewegungs- und Funktionseinschränkungen der Gelenke kann es durch lokale Entzündungsreaktionen (z.B. reaktive Synovitis) zu Schmerzspitzen mit Rötung, Überwärmung und Schwellung der betroffenen Regionen kommen (4).

Die Pathophysiologie der Arthrose ist nicht abschließend geklärt. Die Ätiologie ist sehr vielfältig. Dabei fallen genetische Disposition, Schädigung der Gelenke, im Alter herabgesetzte Regenerationsfähigkeit und metabolische Einflüsse ins Gewicht (4).

Proinflammatorische Zytokine und Mediatoren spielen bei der Entstehung und dem Progress der Arthrose eine große Rolle (5). Sie führen zu einer Änderung im Phänotyp der Chondrozyten, die ihre Differenzierung verlieren und hypertrophieren, hin zur Sekretion Matrix abbauender Enzyme (z.B. MMPs) und zur verminderten Produktion wichtiger EZM Bestandteile (z.B. Aggrecan, Kollagen Typ II) (5). Das dabei entstehende Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Einflüssen führt zum zunehmenden Knorpelverlust, wobei es durch die begleitende lokale Entzündung zu einer Aufrechterhaltung und Verschlechterung der Prozesse im Sinne eines *circulus vitiosus* kommt (4).

Bis zum heutigen Tag kann Arthrose nicht *ad integrum* geheilt werden. Der Fokus in der Therapie liegt einerseits in der Prävention (durch Vermeidung unphysiologischer Gelenkbelastung und gelenkschonendes Bewegungstraining), bei bereits

aufgetretener Arthrose in der biopsychosozialen Begleitung der Patient_innen¹ sowie symptomatischer Behandlung zur Schmerzlinderung und Funktionsverbesserung der Gelenke (4). Hierzu empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie stadien- und symptomabhängig unter anderem motivationale Patient_innenedukation, Bewegungstherapie und Physiotherapie, Ergotherapie, orthopädische Hilfsmittel, einige physikalische Therapien, NSAR topisch und oral sowie Corticosteroide intraartikulär (4). Des Weiteren gibt es eine Fülle an Therapieoptionen deren Nutzen aufgrund mangelnder oder widersprüchlicher Studienlage strittig ist. Reicht die konservative Therapie nicht aus, kann operativ vorgegangen werden. Gelenkerhaltend können die Osteotomie bei Achsabweichung und die Radiosynoviorthese zur Schmerzreduktion bei rezidivierenden Synovialitiden durchgeführt werden (4). *Ultima ratio* sind schlussendlich gelenkersetzende Therapieverfahren der Endoprothetik (4).

1.3 Ansätze zur Knorpel Regeneration

Bei lokal begrenzten Knorpeldefekten können lokale knorpelersetzende Verfahren zum Einsatz kommen, um den Beginn einer Arthrose zu verhindern oder hinauszuzögern. Dieses Feld ist Gegenstand aktueller Forschung, denn auch wenn sich einige Verfahren bereits im klinischen Alltag etablieren konnten, liegt die Versagerrate doch wesentlich höher als gedacht und bereits klinisch verwendete Knorpelprodukte erreichen nicht den Differenzierungsgrad von gesundem Knorpel (8, 9).

Zur Reparatur von Knorpeldefekten werden verschiedenste Techniken angewandt. Bei der Abrasionschondroplastik werden defekte Knorpelanteile minimalinvasiv (meist durch Fräsen im Rahmen einer Arthroskopie) entfernt, um eine glatte Artikulationsfläche wiederherzustellen (10). Bei der Mosaikplastik wird ein Knorpel-Knochenstück von einer nicht tragenden Stelle entnommen, um damit einen bis zum Knochen reichenden Defekt zu decken (10). Die Pridie Bohrung und die Mikrofrakturierung beruhen auf einer Eröffnung des Markraumes im Knochen, einer Blutpfropfbildung im geschädigten Knorpelareal und einer damit einhergehenden Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen, welche den Defekt mit fibrösem Knorpelgewebe füllen (10). Keine dieser genannten Techniken brachte bei großen

¹ In dieser Arbeit wurde sich um geschlechtersensible Sprache bemüht. Deshalb wurde nach Möglichkeit eine Form gewählt, in der sich Menschen beider Geschlechter genauso wie Menschen ohne Zuordnung zur binären Geschlechteraufteilung wiederfinden können.

Defekten die gewünschten Erfolge, deshalb begann man zellgestützte Verfahren zu entwickeln. Bei der autologen Chondrozyten Implantation (ACI) werden Chondrozyten von nicht tragenden Stellen bioptisch entnommen, im Labor vermehrt und minimalinvasiv an die betreffenden Stellen implantiert und mit Periost oder einer Kollagenmembran gedeckt (10, 11). Um die Methode weiter zu verbessern wurde die matrixgestützte autologe Chondrozyten Transplantation (MACT) entwickelt. Hierbei werden die entnommenen Chondrozyten auf oder in speziellen Matrices kultiviert, wodurch man sich eine bessere Differenzierung der Chondrozyten und eine leichtere Handhabung der Produkte in der Operation verspricht (10, 11).

Ein Problem zellbasierter Ansätze ist jedoch die Kultivierung der Chondrozyten im Labor. Löst man Chondrozyten aus dem Gewebeverband und nimmt sie *in vitro* in Monolayer Kultur, so verlieren sie ihre charakteristischen Eigenschaften. Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Prozess ist seit den 60er Jahren bekannt (5). Dabei nehmen die Chondrozyten einen fibroblastenartigen Phänotyp an, wodurch es zur Bildung fibrösen Gewebes kommt (12). Dieser Phänotyp ist charakterisiert durch die vermehrte Bildung von Kollagen Typ I und III und Abnahme von Kollagen Typ II, einer verminderten Bildung von Aggrecan, einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors SOX9 (der für die Expression des COL2A1 Gens notwendig ist) und einer erhöhten Expression von MMP13 (5). Deshalb hat sich die COL2A1/COL1A1-Ratio als ein Maßstab für die Einschätzung der Differenzierung von Chondrozyten durchgesetzt.

Um der Dedifferenzierung entgegen zu wirken werden verschiedenste Ansätze verfolgt. Es wird postuliert, dass ein wichtiger Differenzierungsstimulus für Chondrozyten in den Zell-Zell Kontakten liegt, womit die positiven Effekte die man durch Kultivierung in hoher Zelldichte (*high density*; HD) und in dreidimensionalen (3D) Kulturen beobachtet, erklärt werden (13-15). Weiterhin wichtig für die Differenzierung sind Kontakte der Zellen mit den Oberflächen auf denen sie kultiviert werden (16), denn diese Oberflächen oder Leitschienen sollen während der Kultivierung der Zellen deren EZM ersetzen bzw. simulieren (3). Viele verschiedene Materialien wurden getestet, um Chondrozyten darauf oder darin zu kultivieren, einige sind bereits in klinischer Anwendung (s. Tabelle 1) (17).

Tabelle 1: Knorpelprodukte, die bereits in klinischer Verwendung sind, modifiziert nach Huang et al. (17).

Produkt	Chondrozyten	Material der Matrix
Biocart™II	autolog, unbekannte Passage	gefriergetrocknetes Fibrin/Hyaluronsäure
Bioseed® -C	autolog, unbekannte Passage	Polyglactin (Vicryl)/Polydixanon (PDS), Fibrinträger
Cartipatch®	autolog, bis Passage 3	Agarose-Alginat Hydrogel
Chondrosphere®	autolog, unbekannte Passage	Leitschiene frei
Hyalograft® C	autolog, bis Passage 3	Netz aus Hyaluronsäure basierter Mikrofaser
MACI®	autolog, Passage 1-3	Kollagen I/III Leitschiene aus Schweineperitoneum
NeoCart®	autolog, unbekannte Passage	wabenartiger Zellträger aus Rinderkollagen Typ I
NOVOCART® 3D	autolog, Passage 1	Chondroitinsulfat enthaltender doppelagiger Kollagen I Schwamm
RevaFlex™	allogen, juvenil, unbekannte Passage	Leitschiene frei
CaReS®	autolog, primär	Kollagen Typ I Hydrogel
INSTRUCT	autolog, primäre Chondrozyten und Knochenmarkzellen	3D gedruckte Leitschiene aus Polyethylenoxidterephthalat-Polybutylenterephthalat-Copolymer (PEOT-PBT)

Eine vergleichende Studie mit Analysen aus Überschuss von MACT Operationen (MACI®, Hyalograft® C, CaReS® und Novocart®3D) zeigte die beste COL2A1/COL1A1-Ratio in Chondrozyten im Hydrogel CaReS®, jedoch erreichte keine der untersuchten Produkte die Differenzierung nativen Knorpels (9).

Eine weitere Optimierung der *in vitro* Kultivierung von Chondrozyten stützt sich auf deren Fähigkeit, auf physikalische und chemische Reize zu reagieren. Positive Effekte

ließen sich unter anderem durch elektromagnetische Felder eines bestimmten Spektrums (18) oder hydrostatischen Druck und Perfusion (19) erzielen. Des Weiteren sind für verschiedene Wachstumsfaktoren Verbesserungen in der Expansion und Differenzierung von Chondrozyten gezeigt worden (20, 21).

1.4 Hydrogel aus bakterieller Zellulose

Hydrogele sind Gele mit hohem Wasseranteil, die aus verschiedenen Materialien bestehen können. Einige davon kann man auch zur Zellkultur verwenden, wobei die Zellen entweder auf die Oberfläche des Gels aufgebracht oder im Gel als 3D Kultur eingeschlossen werden.

Bakterielle Zellulose (BC) ist von Mikroben (meist *Gluconacetobacter xylinus*) extrazellulär produzierte Zellulose (22). Diese kann aus den Bakterienkulturen isoliert und dann weiterverwendet werden.

Hydrogele aus BC sind in den vergangenen Jahren im Bereich der Zellkultur und Gewebekonstruktion ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt, da sie über viele wünschenswerte Eigenschaften verfügen. Dazu zählen u.a. Biokompatibilität, Stabilität, hohe Wasserbindungskapazität und Porosität der BC Hydrogele (23). Die Möglichkeit das BC Hydrogel chemisch oder physikalisch zu verändern birgt zusätzliche Chancen, da es so an verschiedene Bedürfnisse angepasst werden kann. Durch Einbringen von Poren in das BC Hydrogel kann es den Zellen ermöglicht werden in einer 3D Umgebung zu proliferieren. Solche Poren konnten bereits mit Paraffin Kügelchen (24), durch LASER-Perforation (25) und mittels Gefriertrocknung (26) in BC Hydrogele eingebracht werden.

So konnte auch ein großer Nachteil der BC Hydrogele, der fehlende biologische Abbau, umgangen werden: durch chemische Modifikation konnte BC dem Abbau durch Lysozym zugänglich gemacht werden (27) und es konnte der biologische Abbau eines BC Hydrogels durch Bestrahlung mit Elektronen begünstigt werden (28).

Die Biokompatibilität von BC Hydrogelen konnte bereits für verschiedene Zellarten gezeigt werden (23, 29). Darüber hinaus erreichten HUVECs sogar einen stabilen differenzierten Zustand nach dreiwöchiger Kultivierung auf einem mit Kollagen beschichtetem BC Hydrogel (30).

Auch in der Redifferenzierung von Chondrozyten auf BC Hydrogel konnten verschiedene Erfolge verzeichnet werden (24-26, 31, 32). Dies macht BC Hydrogele zu attraktiven Kandidaten für neue Ansätze in der Knorpelregeneration.

1.5 Kultur in hoher Zelldichte

Als ein sehr wichtiger Differenzierungsstimulus für Chondrozyten wird die HD Kultur postuliert (13). Schon mehrfach wurde die Zelldichte, in der Chondrozyten im Versuch ausplattiert wurden, als wichtigster Faktor für den Differenzierungsgrad oder die mechanische Stabilität des Knorpelkonstrukts identifiziert (15, 33). Die Schlüsselrolle für die Erfolge der HD Kultur wird den Zell-Zell-Kontakten zugeschrieben, deren Ausbildung durch die hohe Zelldichte ermöglicht wird (13, 34). Eine zweidimensionale Zellkultur mit Ausbildung eines Zellrasens schafft generell bessere Voraussetzungen für mögliche Transfers auf weitere Oberflächen oder alleinige Zelltransfers ohne die Matrix. Des Weiteren sind zweidimensionale Systeme im Labor der direkten lichtmikroskopischen Beobachtung oder histologischen Färbung besser zugänglich, was der Charakterisierung des Systems in der Grundlagenforschung zuträglich ist.

1.6 Pelletkultur

Eine beliebte Möglichkeit, hohe Zelldichten zu erreichen, ist die 3D Kultur. Es wurden wiederholt gute Differenzierungsergebnisse in verschiedenen 3D Kultur-Systemen erreicht (13, 14, 35). Häufig wird jedoch die Pelletkultur verwendet, wenn es darum geht das chondrogene Potential zu analysieren und zu vergleichen (36, 37) oder nach *in vitro* Kultivierung zu stabilisieren (14, 20). In der Pelletkultur kann sowohl der Phänotyp der Zellen ohne störende Leitschienen oder Fremdmaterialien beobachtet werden als auch ein sehr hoher Differenzierungsgrad und die Bildung von EZM erreicht werden (38). Dies macht die Pelletkultur zum Goldstandard der *in vitro* Analyse des chondrogenen Potentials. Für die klinische Anwendung sind jedoch alternative Knorpelkonstrukte wünschenswert, da Pellets aufgrund ihrer sphärischen Form und kleinen Größe kompliziert in der Handhabung und der Verankerung im Defektgebiet sind.

1.7 Chondrozyten aus Entnahmegebieten mit oder ohne Arthrose?

Beim wissenschaftlichen Arbeiten mit humanen artikulären Chondrozyten im Bereich der regenerativen Medizin stellt sich immer die Frage, ob gesunde Zellen (non-OA) oder Zellen aus bereits von Arthrose betroffenen Gebieten (OA) verwendet werden sollen. Für non-OA Chondrozyten spricht das allgemein angenommene bessere Redifferenzierungspotential. Bei autologen zellgestützten Verfahren ist jedoch fraglich,

ob in der klinischen Praxis überhaupt non-OA Zellen bei den Betroffenen entnommen werden können. Besonders, wenn zellgestützte Verfahren zukünftig nicht nur auf junge ansonsten gesunde Patient_innen mit lokalisierten Knorpeldefekten begrenzt bleiben, sondern auch für Arthrosepatient_innen angewendet werden sollen. Spätestens dann wird die Verwendung von OA Chondrozyten unumgänglich. Inzwischen verdichten sich jedoch die Hinweise, dass OA Chondrozyten ebenso wie non-OA Chondrozyten zur Redifferenzierung in der Lage sind (36, 39).

1.8 Fragestellung

Im Bereich der regenerativen Medizin und Geweberekonstruktion soll die EZM der Gewebe durch Matrizen oder Leitschienen ersetzt und mit Zellen besiedelt werden, um neues, gesundes Gewebe im Labor herzustellen, welches dann zur Defektdeckung in Patient_innen verwendet werden kann. Die Wechselwirkung zwischen Zellen eines Gewebes und ihrer EZM ist sehr dynamisch, hoch komplex und von wechselseitiger Beeinflussung geprägt (3). Um eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen zu erreichen wird deshalb angenommen, dass die gewählte Matrix die natürliche EZM des Gewebes möglichst gut imitieren sollte (3). Wegen des hohen Wassergehaltes von Knorpelgewebe wurde für diesen Versuchsansatz ein Hydrogel gewählt, da angenommen wurde, dass die Chondrozyten von der wässrigen Umgebung profitieren würden.

Wegen der oben genannten positiven Eigenschaften von BC und den bereits erzielten Erfolgen im Bereich Zelldifferenzierung, wurde für diesen Versuchsansatz ein BC Hydrogel gewählt. Um keine sonstigen Parameter zu verändern, sondern lediglich den Effekt durch die Matrix an sich zu analysieren, wurde das BC Hydrogel nicht modifiziert. Da die Porengröße in unmodifizierter BC zu klein ist um ein Einwachsen der Zellen zu ermöglichen (23), wurde somit auf die Möglichkeit einer in die Matrix implementierten 3D Kultur verzichtet.

Um die möglichen Nachteile durch den Verzicht auf eine in die Matrix implementierten 3D Kultur zu kompensieren wurde eine HD Kultur gewählt, da auch diese die Ausbildung intensiver Zell-Zell Kontakte ermöglicht.

Um das neue System mit den etablierten Standards zu vergleichen, wurde die Pelletkultur als positive Vergleichsgruppe gewählt und eine HD Kultur auf Polystyrol als negative Vergleichsgruppe hinzugefügt.

Um OA und non-OA Chondrozyten gleichermaßen zu analysieren, wurden für diesen Versuchsansatz zwei Gruppen gebildet, eine mit OA Chondrozyten und eine mit non-OA Chondrozyten.

Die Fragestellung dieses Versuchsansatzes war:

- a) Profitieren humane artikuläre Chondrozyten in HD Kultur von einer Kultivierung auf einem BC Hydrogel?
- b) Zeigt sich dabei ein Unterschied zu den Kontrollgruppen (Pelletkultur, HD Kultivierung auf Polystyrol)?
- c) Zeigt sich dabei ein Unterschied zwischen OA und non-OA Chondrozyten?

1.9 Versuchsansatz

Für den Versuchsansatz wurden humane OA und non-OA Chondrozyten aus Kniegelenksknorpel isoliert. Diese wurden entweder in Pelletkultur (Pellet), auf BC Hydrogel (HD Hydrogel) oder auf Polystyrol (HD Polystyrol) kultiviert.

Zur Validierung der verwendeten Zelldichte wurde im Voraus ein verkürzter Versuch in niedriger Zelldichte (*low density*, LD) mit den Versuchsgruppen Pellet, LD Hydrogel und LD Polystyrol durchgeführt und auf Expression von *COL2A1* und *COL1A1* untersucht.

Die Ergebnisse der HD Versuche wurden mittels Genexpressionsanalyse auf knorpelspezifische Gene (*COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*) und auf Gene, die auf Dedifferenzierung und Degeneration hinweisen (*COL1A1*, *MMP13*) sowie histologischer Färbung analysiert (s. Abbildung 1).

Eine detaillierte Darstellung über den Versuchsablauf in der Zellkultur findet sich in Kapitel 2.2.2.11 „Versuchsaufbau“.

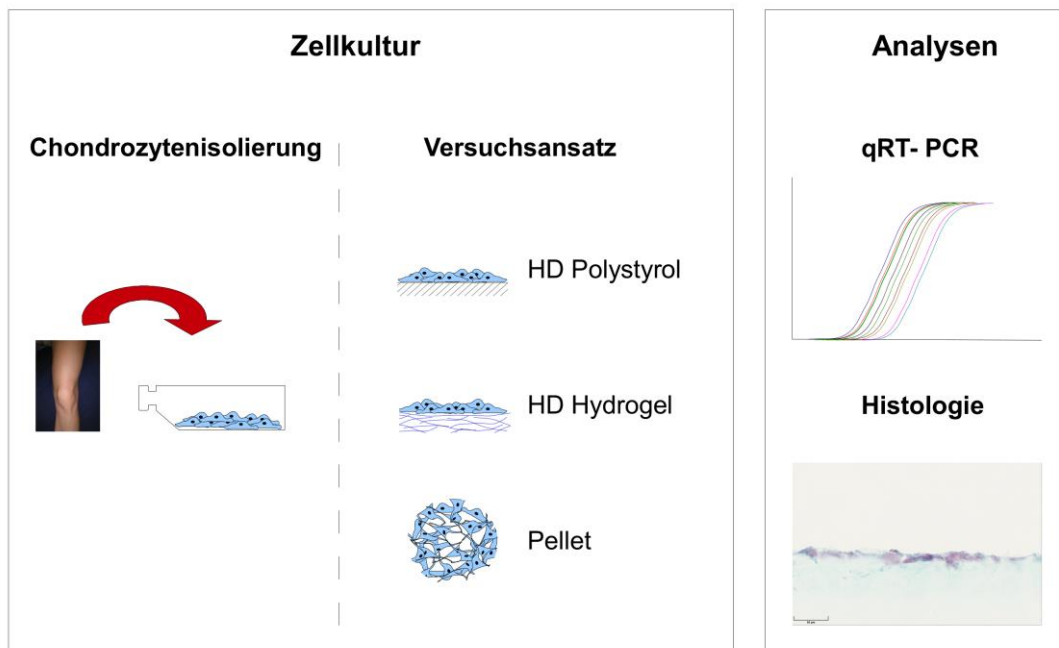


Abbildung 1: Graphisches Schema zu Ablauf und Auswertung der Versuche. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

2 Material und Methoden

Alle Versuche wurden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie, Feodor-Lynen-Straße 19, 81377 München durchgeführt.

Sämtliche verwendeten Instrumente und Materialien sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Instrumente.

Name	Hersteller
Analysewaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Autoklav	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Brutschrank CO ₂ Inkubator CB 150	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Chirurgische Pinzette	Thomas-Medical (Maishofen, Österreich)
Cryo-Lagerbehälter Biosafe	Cryotherm (Kirchen, Deutschland)
Dewar Transportgefäß Typ B	KGW-Isotherm (Karlsruhe, Deutschland)
Digitales Lichtmikroskop Precipoint M8	Precipoint (Freising, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Ionenaustauscher Aquadem	Werner, (Leverkusen, Deutschland)
Kryostat Leica CM3050	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland)
Kryostat Messerblock	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland)
Kühlschrank 4 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kühlzentrifuge Multifuge 1L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Lichtmikroskop Axio Vert. A1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
LightCycler 96	Roche (Basel, Schweiz)

Magnetstab	Rotilabo, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mikro-Dismembrator S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
NanoDrop Lite Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer Improved Zählkammer	Assistent, Hecht (Sondheim, Deutschland)
Pipette 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson (Madison, USA)
Pipettierhelfer Accu-jet Pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Sterilbank BDK-SB 1200	BDK, Weiss Pharmatechnik (Sonnenbühl, Deutschland)
Stickstofftank Apollo	Cryotherm (Kirchen, Deutschland)
Thermal Cycler T100	Bio-Rad (Hercules, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Transferpipette 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Brand (Wertheim, Deutschland)
Trocken- und Wärmeschrank	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Vortex Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS (Tokio, Japan)
Wärmebad TW 20	Julabo (Seelbach, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
6-Well Hydrogelmatrix Zellkulturplatte	Xellutec (Neuried, Deutschland)
6-Well Zellkulturplatte	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Alufolie Universal	Korff (Oberbipp, Schweiz)
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Desinfektionsflüssigkeit Gigasept AF forte	Schülke (Norderstedet, Deutschland)
Einfrierröhrchen 1,0 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einfrierröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Einmalhandschuhe Nitril	Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmalskalpell	Braun (Melsungen, Deutschland)
Eis	Eismaschine (s. o.)
Eppendorf Tubes, PCR clean 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ethanol 80 %	Apotheken der Kliniken der Universität München (München, Deutschland)
Eukitt	Orsatec (Bobingen, Deutschland)
Flächendesinfektionsmittel Bacillol AF	Bode, Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Flächendesinfektionstücher Pursept-A	Schülke (Norderstedt, Deutschland)
Flüssiger Stickstoff	Linde (München, Deutschland)
Gewebeprobeformchen	Sakura Finetek (Tokio, Japan)
Händedesinfektionsmittel Sterillium	Bode, Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Küchenrolle	GVS Group (Heidenheim, Deutschland)
LightCycler 96 Well Platte	Roche (Basel, Schweiz)
LightCycler Versiegelungsfolie	Roche (Basel, Schweiz)
Mikrotom Einmalklingen	Feather (Osaka, Japan)
Objektträger Superfrost plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PCR- Tubes	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Petrischalen	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettenspitzen Diamond Tipack 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson (Madison, USA)
Pipettenspitzen RNase-, DNase-, Pyrogenfrei 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Präparatekasten	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
RNase Inaktivierungsspray	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Serologische Pipette 1 ml, 2 ml	Falcon, Corning Incorporated (New York, USA)
Serologische Pipette Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Spritze 10 ml, 20 ml	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)

Spritzenfilter 0,22 µm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Spritzenkanüle 20 1 ½ ″	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Stahlkugeln 9 mm	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Steriles Abdecktuch Secu-Drape	Sengewald (Rohrdorf, Deutschland)
Sterilisationsbeutel	Ancor Flexibles, Brömeda (Sassenberg, Deutschland)
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek (Tokio, Japan)
Wasserbadschutz Aqua Stabil	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Zellkulturflasche 175 cm ²	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturflasche Tripel 500 cm ²	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellschaber 1,8 cm	Falcon, Corning Incorporated (New York, USA)
Zellsieb 100 µm	Falcon, Corning Incorporated (New York, USA)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon, Corning Incorporated (New York, USA)

2.1.2.1 Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose

Das Hydrogel bestand aus mikrokristalliner bakterieller Zellulose, synthetisiert von *Gluconacetobacter xylinus* (30). Hinsichtlich Biokompatibilität, Zelladhärenz, und Zellproliferation war die Hydrogelmatrix bereits charakterisiert worden (41). Die Hydrogelmembranen wurden auf Ringen aufgezogen geliefert, die in 6-Well Platten lagen, je ein Ring mit Membran pro Well. Um nicht auszutrocknen war sie allseits von PBS bedeckt (s. Abbildung 2).



Abbildung 2: 6-Well Platte BC Hydrogel. In der rechten Spalte sind die ringförmigen Rahmen bestückt mit Hydrogelmembranen aus bakterieller Zellulose, bedeckt mit PBS und mit Folie versiegelt.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Name	Hersteller
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ambion Trizol Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNase/RNase freies Wasser	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronlauge	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
PBS Dulbecco	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Sucrose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme.

Name	Hersteller
Collagenase	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pronase	Roche (Basel, Schweiz)
Trypsin/ EDTA	Biochrom (Berlin, Deutschland)

2.1.5 Fertigsysteme

Tabelle 6: Liste der verwendeten Fertigsysteme.

Name	Hersteller
Faststart Essential DNA Green Master	Roche (Basel, Schweiz)
Quanti Tect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Germany)

2.1.6 Medien und Medienzusätze

Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien und Medienzusätze.

Name	Hersteller
Amphotericin B	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMEM/ Ham´s F-12	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Dulbecco´s MEM	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Fetales Kälberserum	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Mem Aminosäuren	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)

Tabelle 8: Zusammensetzung des Waschmediums.

Waschmedium/ Transportmedium	
Dulbecco´s MEM	500 ml
Penicillin/ Streptomycin	10 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung des Chondrozytenmediums.

Chondrozytenmedium	
DMEM/ Ham´s F-12	500 ml
Ascorbinsäure	0,0125 g
Mem Aminosäuren	5 ml
Penicillin/ Streptomycin	3 ml
Amphotericin B	50 µl
Fetales Kälberserum	50 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung des Einfriermediums.

Einfriermedium	
Chondrozytenmedium	35 ml
Dimethylsulfoxid	5 ml
Fetales Kälberserum	10 ml

2.1.7 Humane Chondrozyten

Die non-OA Chondrozyten wurden aus Knieknorpel von jungen gesunden Verstorbenen (<35 Jahren) ohne sichtliche Arthropathien mit einem BMI <25 bis zu 48 Stunden *post mortem* gewonnen (s. Tabelle 11).

Die OA Chondrozyten wurden aus Knieknorpel isoliert der von Patient_innen, die sich einer totalen Knie-Endoprothesen Operationen unterzogen, gespendet wurde (s. Tabelle 11). Dazu wurde vor dem Eingriff schriftlich das Einverständnis der Patient_innen eingeholt (s. Anhang).

Die Zellpopulationen wurden nach der Reihenfolge der Entnahme aus den Spender_innen benannt. Vor Weiterverarbeitung der Knorpelproben im Labor wurden die Spender_innen auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet. Zum Schutz der Mitarbeiter_innen wurde der Knorpel nur bei negativer Serologie weiterverarbeitet.

Ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU (Nr. 69-16) zur Gewinnung und Weiterverarbeitung der Chondrozyten liegt vor.

Tabelle 11: Charakterisierung der Chondrozyten Spender_innen.

Zellart	Geschlecht	Alter
Non-OA Chondrozyten	männlich	20
	männlich	26
	weiblich	27
	männlich	29
OA Chondrozyten	weiblich	62
	weiblich	63
	weiblich	72
	weiblich	73

2.1.8 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Alle Primer wurden von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primer. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

Gen		Primer Sequenz	Literaturstelle
<i>GAPDH</i>	vorwärts	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	(42)
	rückwärts	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG	
<i>COL2A1</i>	vorwärts	GTT ATC GAG TAC CGG TCA CAG AAG	(43)
	rückwärts	AGT ACT TGG GTC CTT TGG GTT TG	
<i>ACAN</i>	vorwärts	CAG CAC CAG CAT CCC AGA	(43)
	rückwärts	CAG CAG TTG ATT CTG ATT CAC G	
<i>COL1A1</i>	vorwärts	TGA CCT CAA GAT GTG CCA CT	(44)
	rückwärts	ACC AGA CAT GCC TCT TGT CC	
<i>Sox9</i>	vorwärts	AGA CCT TTG GGC TGC CTT AT	(45)
	rückwärts	TAG CCT CCC TCA CTC CAA GA	
<i>MMP13</i>	vorwärts	GAC TTC ACG ATG GCA TTG CTG	(46)
	rückwärts	GCA TCA ACC TGC TGA GGA TGC	

2.1.9 Histologische Färbungen

Tabelle 13: Liste der verwendeten Chemikalien für die histologischen Färbungen.

Name	Hersteller
Aqua Dest	Ionenaustauscher (s.o.)
Essigsäure 100 %	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 70 %, 96 %, 100 %	Apotheken der Kliniken der Universität München (München, Deutschland)
Lichtgrün 0,2 %	Morphisto (Frankfurt, Deutschland)
Safranin O 0,1 %	Morphisto (Frankfurt, Deutschland)
Xylol	SAV LP (Flintsbach am Inn, Deutschland)

2.1.10 Software

Tabelle 14: Liste der verwendeten Software.

Name	Herausgeber/ Entwickler
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Inc. (San José, USA)
EndNote X7	Alfasoft AB (Göteborg, Schweden)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Touch Microscope	Precipoint (Freising, Deutschland)
Windows 7	Microsoft (Redmond, USA)
Snipping Tool	Microsoft (Redmond, USA)
paint.net 4.2.2	dotPDN LLC
GIMP 2.10.12	Freie Software
LightCycler 96 SW 1.1	Roche (Basel, Schweiz)
PDF24 Creator 9.0.6	geek software GmbH (Berlin, Deutschland)
SAS Version 9.4 für Windows	SAS Institute (Cary, USA)
Axiovision SE64 Rel. 4.9	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Um sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurden alle Arbeitsschritte der Zellkultur unter der Sterilbank durchgeführt. Kurz vor ihrer Verwendung wurden Medien, Zusätze und Reagenzien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Inkubiert wurden alle Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit als Standardbedingungen. Zellen, die nicht sofort verwendet wurden, wurden im Cryolagerbehälter aufbewahrt.

Viele Reaktionen der verwendeten Enzyme laufen nur in Umgebungen mit physiologischer Elektrolytkonzentration und stabilem pH-Wert ab, da ansonsten ausfallende Salze wichtige Bindungsstellen der Enzyme besetzen können. In diesem Fall wurde vorher mit PBS gewaschen, um eine möglichst physiologische Umgebung zu gewährleisten.

Alle RNA- und DNA-Proben wurden während der Analysen stets auf Eis aufgetaut und gehandhabt. Arbeiten mit RNA und DNA fanden in einem separaten Raum unter einer Schutzhaube statt.

Gesundheitsgefährdende Stoffe, besonders in der RNA-Extraktion und der Histologie, wurden nur unter einem Abzug verwendet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Mediumwechsel

Die Mediumwechsel erfolgten dreimal pro Woche. Dabei wurde erst das Medium möglichst vollständig abpipettiert und dann frisches hinzugegeben (s. Tabelle 15). Vor jedem Mediumwechsel erfolgte eine kritische Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich der Zellmorphologie, der Zelldichte und etwaiger Fremdkörper, die auf eine Kontamination der Kultur hindeuten könnten. Eine Betrachtung der Pelletkulturen war unter dem Mikroskop nicht möglich, hier wurde die Pelletmorphologie und das Medium gegen das Licht begutachtet. Eine Trübung des Mediums wurde als Kontamination gewertet.

Tabelle 15: Menge des verwendeten Mediums in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturbehälters.

Zellkulturbehälter	Mediummenge [ml]
Zellkulturflasche Tripel 500 cm ²	75
Zellkulturflasche 175 cm ²	25
6-Well (pro Well)	2
Pellettube	2

2.2.2.2 Zellen einfrieren

Die Zellen wurden trypsiniert (s. 2.2.2.4) und gezählt (s.2.2.2.5). In 1,5 ml Einfriermedium wurden stets jeweils 2×10^6 Zellen resuspendiert und anschließend in ein Einfrierröhrchen gegeben. Dieses wurde, um Schäden an den Zellen zu vermeiden, sofort im Gefrierschrank bei -80 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag wurden die Einfrierröhrchen in den Cryolagerbehälter überführt.

2.2.2.3 Zellen auftauen

Um die Zellintegrität möglichst zu schonen wurden die folgenden Arbeitsschritte rasch ausgeführt. Ein Falcon mit 15 ml Chondrozytenmedium wurde vorbereitet, in welches die Zellen überführt wurden. Dazu wurde das Einfrierröhrchen so lange in der Hand angewärmt, bis das Medium sich verflüssigte. Um die Überreste des Einfriermediums zu beseitigen, wurden die Falcons mit 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Es folgten Resuspension und Zellzählung (s. 2.2.2.5).

Anschließend wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 25 ml Chondrozytenmedium resuspendiert und in eine 175 cm² Zellkulturflasche überführt. Analog dazu kamen bei größeren Zellzahlen jeweils 3×10^6 Zellen in 75 ml Chondrozytenmedium in eine Tripelflasche.

2.2.2.4 Passagieren

Nimmt man Chondrozyten in herkömmliche Zellkultur, vermehren sie sich. Um dem erhöhten Platzbedarf gerecht zu werden, müssen sie nach einigen Tagen passagiert werden. Dabei werden die Zellen in niedriger Dichte in neue Zellkulturflaschen überführt. Bei geschätzt 70 % bis 80 % Konfluenz unter dem Lichtmikroskop wurden die Chondrozyten in die nächste Passage überführt. Dazu wurde das Medium abpipettiert und mit ausreichend PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 10 % Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert (10 ml Trypsin/EDTA je 175 cm² Zellkulturflasche und 25 ml Trypsin/EDTA je Tripelflasche). Unter dem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob die Zellen sich von der Oberfläche gelöst und die typische runde Form inadhärenter Chondrozyten angenommen hatten. Die Reaktion wurde mit der gleichen Menge Chondrozytenmedium gestoppt und die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt. Dieses wurde dann mit 1500 U/min für 5 min bei 23 °C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen werden und das Zellpellet wurde in Chondrozytenmedium durch sanftes auf und ab pipettieren resuspendiert. Nach Zellzählung (s.2.2.2.5) wurden analog zum Zellen auftauen (s. 2.2.2.3) 1×10^6 Zellen in 25 ml Chondrozytenmedium resuspendiert und in eine 175 cm² Zellkulturflasche überführt. Bei größeren Zellzahlen kamen jeweils 3×10^6 Zellen in 75 ml Chondrozytenmedium in eine Tripelflasche.

Für die Versuche wurden auf diese Weise die Chondrozyten der Spender_innen direkt nach Isolierung in Passage 0 vermehrt und eingefroren, und nach einer weiteren Vermehrungsphase (in Passage 1) ab Passage 2 für die Versuche verwendet.

2.2.2.5 Zellzählung

Für die Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension zunächst in 10 µl Trypanblau auf und ab pipettiert, um beides zu vermischen. Dabei werden intakte Zellen mit hellem Zytoplasma vor dem dunkelblauen Hintergrund sichtbar, denn Zellen mit beschädigter Zellwand nehmen den Farbstoff auf und treten dadurch optisch in den Hintergrund (47). Möglichst zügig wurden nun 10 µl der Zell-/Trypanblaumischung in ein Quadrat der Neubauer Zählkammer überführt. Dieses ist wiederum in 9 Quadrate eingeteilt,

wobei man nur die intakten Zellen in den Quadraten der 4 äußeren Ecken zählt. Mit der Formel

$$\frac{n}{4} \times 2 \times 10^4 = n/ml, \text{ wobei } n = \text{Zellzahl}$$

erhält man dann die Zellzahl pro Milliliter, multipliziert man es mit dem gesamten Suspensionsvolumen, ergibt sich die Gesamtzellzahl.

2.2.2.6 Chondrozytenisolierung

Zur Isolierung der OA Chondrozyten wurden die sterilen Knorpel-Knochenspäne nach Absetzen des Tibiaplateaus in Transportmedium gegeben und gekühlt ins Labor zur Isolierung überführt.

Der non-OA Knorpel der jungen Verstorbenen wurde innerhalb von 48 Stunden durch die diensthabenden Rechtsmediziner_innen vom Tibiaplateau entnommen und in Transportmedium überführt.

Die Knorpelstücke wurden im Labor bis zum Eintreffen der Serologieergebnisse bei 4 °C gelagert und dann sogleich die Chondrozyten isoliert.

Dazu wurden die Knorpelstücke in eine Petrischale überführt, einmal mit Waschmedium gewaschen und störende Gewebeteile wie Fett oder Knochen entfernt. Anschließend wurde der Knorpel mit dem Skalpell in 1-2 mm große Stückchen geschnitten und nochmal zweimal mit Waschmedium gewaschen. Davon wurden 2-3 Stückchen für die histologische Aufarbeitung in Formalin fixiert.

Die verbleibenden Stückchen wurden mit 0,5 % Pronase für 1 Stunde im Brutschrank unter Standardbedingungen (s. 2.2) inkubiert.

Nach 2 anschließenden Waschdurchgängen mit PBS wurde über Nacht mit 0,1 % Collagenase im Brutschrank unter Standardbedingungen (s. 2.2) inkubiert.

Am folgenden Morgen wurden die Knorpelstückchen sorgfältig auf und ab pipettiert und über ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon überführt. Das durch den Filter laufende Medium wurde noch dreimal wieder aufgenommen und erneut durch denselben Filter gefiltert. Mit einem Spritzenstempel wurden zurückbleibende Stücke sanft an den Filter gepresst, bevor an der Unterseite des Filters hängende Zellen mit Chondrozytenmedium abgespült wurden. Der Filter wurde nun einige Male mit PBS gespült. Dann wurde die gefilterte Suspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Das sich am Boden des Falcons absetzende Zellpellet wurde in Chondrozytenmedium resuspendiert.

Danach wurden die Zellen gezählt (s. 2.2.2.5) und zu je 1×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen ausplattiert, bei größeren Zellzahlen zu je 3×10^6 Zellen in Tripelflaschen. Nach zwei Tagen Adhärenzzeit erfolgte der erste Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen eingefroren.

2.2.2.7 Kultur in hoher Zelldichte auf Polystyrol

Pro Well einer 6-Well Platte wurden $9,6 \times 10^5$ Zellen in je 2 ml Chondrozytenmedium ausplattiert. Das entspricht einer Dichte von 10^5 Zellen/cm² (s. Abbildung 3. Für Zellen in Kultur s. Abbildung 5 und Abbildung 6).

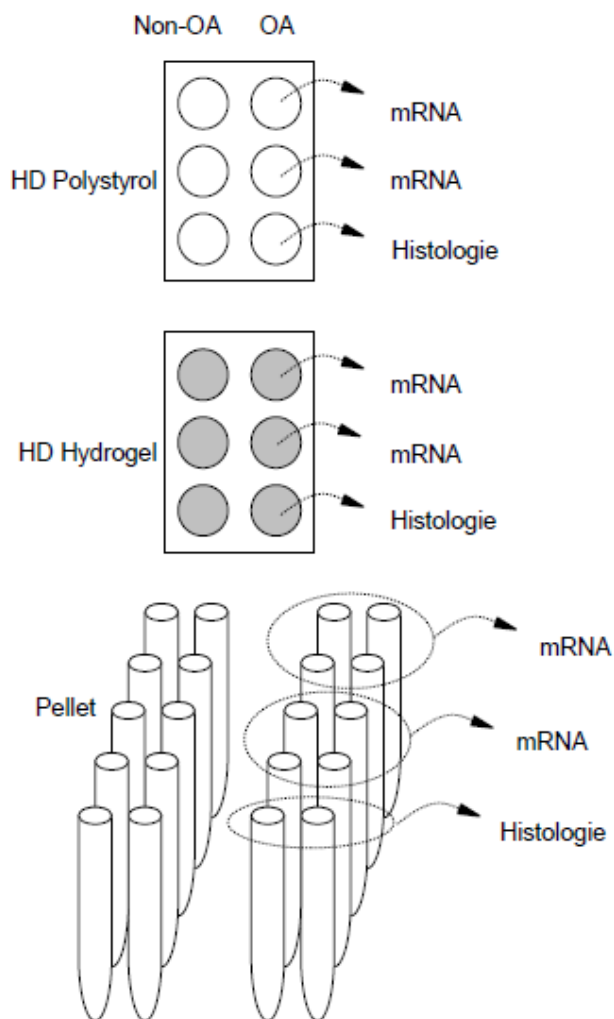


Abbildung 3: Schema zum Ausplattieren der Versuche und zur Probengewinnung am Versuchsende.

2.2.2.8 Kultur in hoher Zelldichte auf Hydrogel

Um die Zellkultur nicht zu verwässern, wurden die Hydrogelmembranen mindestens 24 h vor dem Ausplattieren der Zellen in Chondrozytenmedium mit 20 % fetalem Kälberserum inkubiert. Um die Hydrogelmembranen von beiden Seiten zu benetzen, wurden 2 ml Medium innerhalb des Ringes und 1 ml Medium außerhalb des Ringes pipettiert. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde dieses mittels Pipetten und Spritzen abgezogen.

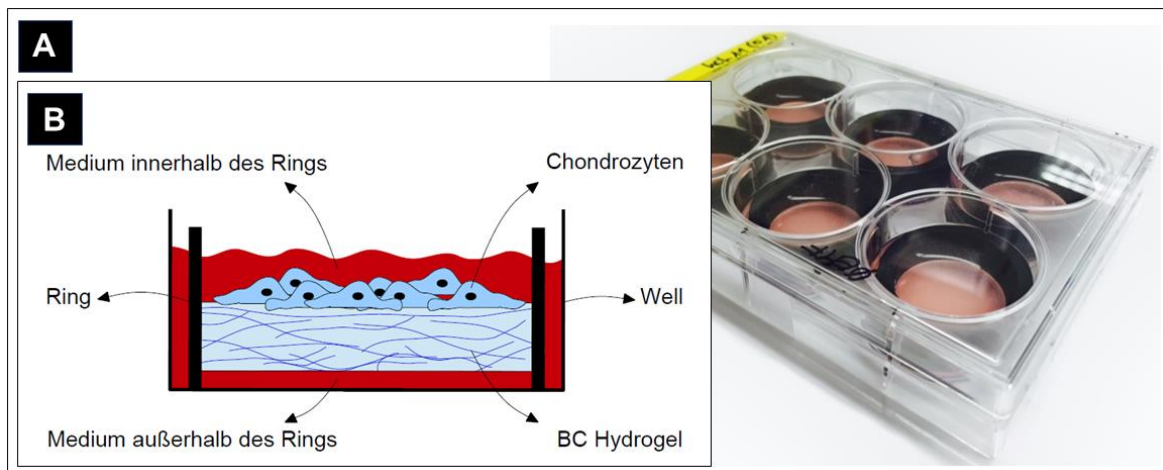


Abbildung 4: A: 6-Well Platte BC Hydrogel, hier beispielhaft mit Chondrozyten in Kultur. B: Querschnitt eines BC Hydrogel Wells als Schemazeichnung.

Ausplattiert wurden pro Well einer 6-Well Platte $5,3 \times 10^5$ Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/cm² in je 2 ml Chondrozytenmedium innerhalb des Ringes auf die Oberseite der Hydrogelmatrix (s. Abbildung 3 und Abbildung 4. Für Zellen in Kultur s. Abbildung 5 und Abbildung 6). Damit die Matrix von unten nicht austrocknete, wurde zwischen Ring und Rand des Wells je 1 ml Chondrozytenmedium gegeben, welches im Versuchsverlauf bei Bedarf nachgegeben wurde.

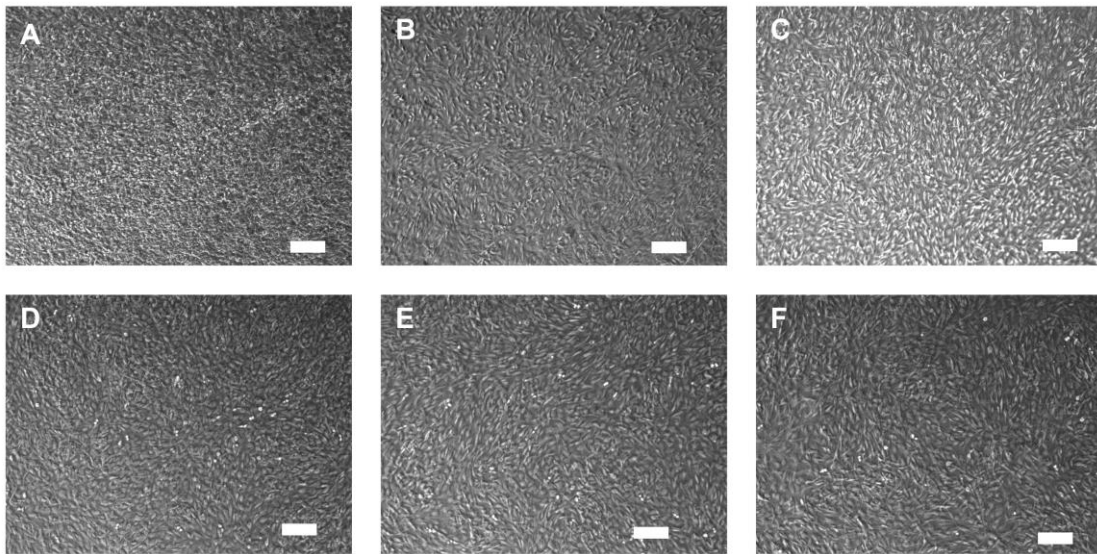


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Bilder von OA Chondrozyten am dritten Tag der HD Kultur auf Hydrogel (A-C) oder auf Polystyrol (D-F). Passage 2 in A und D, Passage 3 in B und E, Passage 4 in C und F. Die Bilder sind in fünffacher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsbalken messen 200 μm .

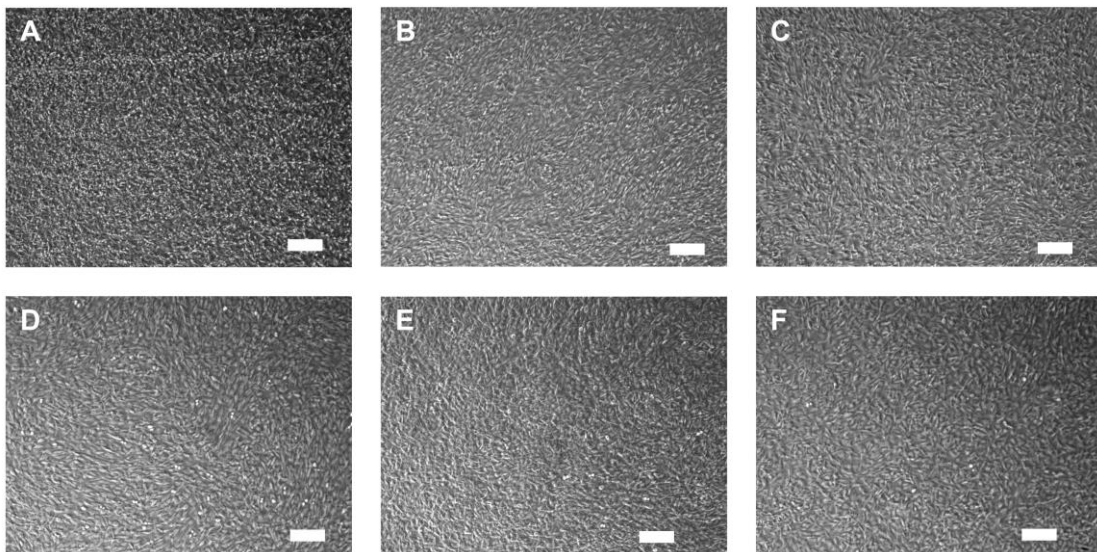


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Bilder von non-OA Chondrozyten am dritten Tag der HD Kultur auf Hydrogel (A-C) oder auf Polystyrol (D-F). Passage 2 in A und D, Passage 3 in B und E, Passage 4 in C und F. Die Bilder sind in fünffacher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsbalken messen 200 μm .

2.2.2.9 Pelletkultur

Jedes Pellet bestand aus 4×10^5 Zellen. Diese wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen in 2 ml Medium suspendiert und anschließend bei Zimmertemperatur für 5 min mit 150 G zentrifugiert. Um die Gaszirkulation zu gewährleisten, wurde der Deckel der

Röhrchen während der Inkubation im Brutschrank nicht fest verschlossen, sondern nur aufgesetzt.

2.2.2.10 Validierung der gewählten Zelldichte

Zur Validierung der gewählten Zelldichte für die 2D Kultursysteme (Kultur auf Polystyrol und auf BC Hydrogel) wurde im Voraus ein verkürzter Versuch mit niedrigerer Zelldichte durchgeführt. Dafür wurden ausschließlich Zellen der Passage 2 verwendet. Für die LD Kultur auf Polystyrol (LD Polystyrol) und auf dem BC Hydrogel (LD Hydrogel) wurden Chondrozyten in einer reduzierten Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/cm² ausplattiert. Das entsprach $4,8 \times 10^5$ Zellen pro Well in der Polystyrolgruppe und $2,65 \times 10^5$ Zellen pro Well in der BC Hydrogelgruppe. Die Zellzahl in der Pelletkultur (Pellet) blieb bei 4×10^5 Zellen pro Pellet.

Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Chondrozyten auf Genexpression von *COL2A1* und *COL1A1* auf mRNA Ebene untersucht.

2.2.2.11 Versuchsaufbau

Humane artikuläre OA und non-OA Chondrozyten wurden enzymatisch aus dem Spender_innen-Knorpel isoliert und eingefroren. Um einen Versuch zu starten, wurden die Chondrozyten aufgetaut, in Passage 1 vermehrt und in Passage 2-4 in den Versuch genommen. Dabei wurden die Chondrozyten im direkten Vergleich für jeweils 7 Tage als HD Kultur auf Polystyrol (HD Polystyrol), auf BC Hydrogel (HD Hydrogel) oder in Pelletkultur (Pellet) kultiviert (s. Abbildung 7).

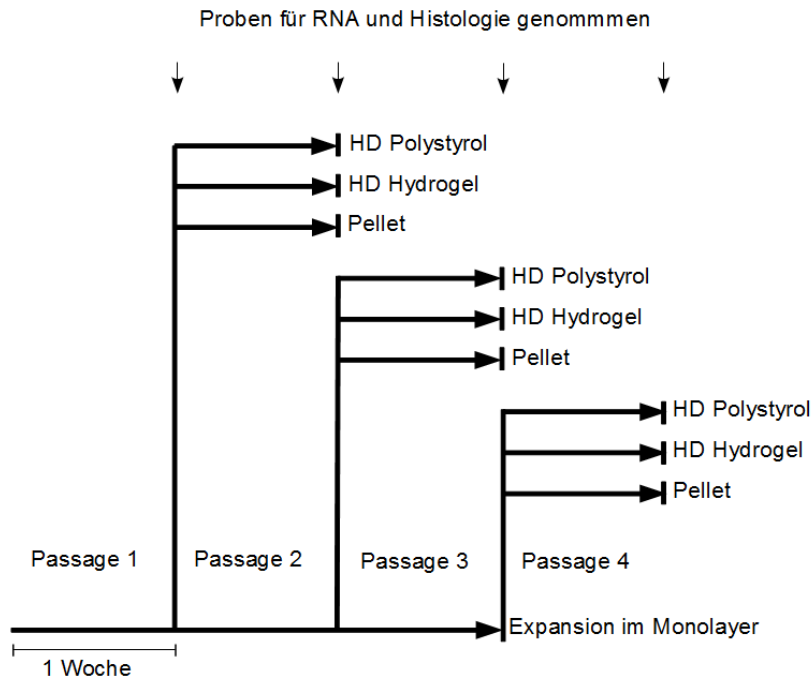


Abbildung 7: Zeitlicher Versuchsablauf in der Zellkultur.

RNA- und Histologieproben wurden jeweils am Ende einer Passage gewonnen. Diese wurden dann im weiteren Verlauf bearbeitet. Die mRNA-Proben wurden zu cDNA revers transkribiert und per quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) auf knorpelspezifische Gene (*COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*) und auf Gene, die auf Dedifferenzierung und Degeneration hinweisen (*COL1A1*, *MMP13*) analysiert. Die histologischen Proben wurden kryokonserviert, als Gefrierschnitt aufgearbeitet, mit Safranin-O/Lichtgrün gefärbt und anschließend die gefärbten Schnitte mittels Bern-Score (48) bewertet.

2.2.3 RNA-Extraktion

2.2.3.1 Probengewinnung und Zell-Lyse

Pro Versuchsgruppe wurden je zwei RNA Proben gewonnen.

Zur RNA-Extraktion aus Pellets wurden je vier Pellets gepoolt, möglichst trocken in ein Schredder-Röhrchen des Mikro-Dismembrator S überführt und dann das Röhrchen samt Pellets kurz in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Pellets einzufrieren. Nach dem Einfrieren wurde die mit Ethanol und Natronlauge aufbereitete 9 mm Stahlkugel hinzugegeben, und alles nochmals in flüssigen Stickstoff gefroren. Anschließend wurde das Schredder-Röhrchen mit Pellet und Kugel darin in den Mikro-Dismembrator S eingespannt und das Pellet bei 3000 rpm für eine Minute geschreddert. Danach

wurde zur Zell-Lyse 1 ml Trizol Reagent ins Schredder Röhrchen gegeben und auf einem Vortex Mixer gemischt. Anschließend wurde die Stahlkugel mit einem Magnetstab entfernt. Die Flüssigkeit wurde dann in ein PCR sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube überführt.

Zur RNA-Extraktion aus Polystyrol 6-Wells wurde das Medium abpipettiert, das Monolayer mit PBS gewaschen und dieses sorgfältig entfernt, anschließend wurde 1 ml Trizol Reagent zur Zell-Lyse hinzugegeben. Dieses wurde mit einer Pipette so lange resuspendiert, bis keine Zellen mehr am Boden klebten, und dann in ein PCR sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube überführt.

Die RNA-Extraktion vom Hydrogel lief analog zu der aus Polystyrol 6-Wells ab, nur mussten hier die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Hydrogel gelöst werden. Die RNA von Tag 0 wurde jeweils am Tag des Versuchsansatzes aus Zellen der Passage 1 extrahiert. Dazu wurden diese in 1 ml Trizol Reagent lysiert, das Lysat in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt.

Ab diesem Punkt konnte dann mit allen Proben gleich verfahren werden. Entweder sie wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C asserviert oder es wurde direkt der nächste Schritt angeschlossen.

2.2.3.2 Phasentrennung

Für die Phasentrennung wurde jedem Eppendorf Tube 200 µl Chloroform hinzugefügt, danach für 15 sec schüttelnd gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Tubes für 30 min bei 4 °C mit 15000 G zentrifugiert. Dabei trennten sich die Proben in eine untere Phenol-Chloroform-Phase die rötlich gefärbt war, eine mittlere weißliche Interphase und eine obere wässrige Phase die farblos war. Diese enthielt die RNA und wurde in neue RNase freie 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt, alles andere wurde verworfen.

2.2.3.3 Präzipitation

Für die RNA-Präzipitation wurde nun 0,5 ml Isopropanol zur wässrigen Phase zugegeben, auf einem Vortex Mixer gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Tubes bei 4 °C mit 25000 G über Nacht zentrifugiert. Dabei wurde die RNA am Boden der Tubes als opakes, gelartiges Pellet sichtbar.

2.2.3.4 Waschen

Nach Verwurf des Überstandes wurde die RNA zweimal mit Ethanol gewaschen. Dazu wurde beim ersten Durchgang 1 ml, beim zweiten Durchgang 0,5 ml Ethanol zur RNA gegeben, 20 min bei 4 °C mit 25000 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. War das Ethanol vollständig entfernt, konnte die RNA in je 32 µl RNase freiem Wasser pro Tube bei Monolayer Proben, und 16 µl RNase freiem Wasser pro Tube bei Pellet Proben, für 20 min bei 37 °C im Thermomixer gelöst werden. Danach wurde die RNA entweder bei -80 °C gefroren oder zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

2.2.3.5 Messen

Die Messung der RNA Konzentration und Reinheit fand mit dem NanoDrop Lite Spectrophotometer statt. Das Gerät wurde mit 2 µl RNase freiem Wasser auf einen Leerwert eingestellt, anschließend wurden je 2 µl jeder Probe für die Messung verwendet und die Werte für jede Probe notiert.

2.2.4 c-DNA-Synthese

Um eine qRT-PCR durchzuführen, muss die RNA in cDNA umgewandelt werden, damit die DNA-Polymerase die zu testenden Sequenzen während der PCR als Substrat erkennen kann. Dafür wurde das Quanti Tect Reverse Transcription Kit (s. Tabelle 16) verwendet.

Tabelle 16: Inhalt des Quanti Tect Reverse Transcription Kit.

Quanti Tect Reverse Transcription Kit

gDNA Wipeout Buffer

Reverse Transcriptase

RT Primer Mix

RT Buffer

RNase-Free Water

Um die Proben später in der qRT-PCR miteinander vergleichen zu können, muss immer die gleiche Menge an RNA umgeschrieben werden. Dazu wurde in Abhängigkeit der gemessenen RNA Konzentration ein entsprechendes Volumen an RNA mit PCR-sauberem Wasser in ein PCR-Tube pipettiert und gemischt, um gleichbleibend 1 µg RNA in 12 µl Wasser zu erhalten (s. Abbildung 8). Spalte E und F der Abbildung 8 stellen dabei das verwendete Pipettierschema dar.

A	B	C	D	E	F
ID	Probenname	ng/μl	μg/μl	1μg RNA	H ₂ O
365	hch 25 (OA) ML P4 Tag 7	762,6	0,763	1,31	10,69
366	hch 16 (Non-OA) ML P4 Tag 7	479,3	0,479	2,09	9,91
367	hch 16 (Non-OA) ML P4 Tag 7	456,4	0,456	2,19	9,81
368	hch 25 (OA) Xe P4 Tag 7	300,7	0,301	3,33	8,67
369	hch 25 (OA) Xe P4 Tag 7	263,7	0,264	3,79	8,21
370	hch 16 (Non-OA) Xe P4 Tag 7	355,1	0,355	2,82	9,18
371	hch 16 (Non-OA) Xe P4 Tag 7	125,7	0,126	7,96	4,04
372	hch 25 (OA) Pellets P4 Tag 7	127,6	0,128	7,84	4,16
373	hch 25 (OA) Pellets P4 Tag 7	276,5	0,277	3,62	8,38
374	hch 16 (Non-OA) Pellets P4 Tag 7	156,3	0,156	6,40	5,60
375	hch 16 (Non-OA) Pellets P4 Tag 7	307,3	0,307	3,25	8,75

Abbildung 8: Beispiel zur Verdünnung der RNA auf 1 μg pro Tube. Werte der Spalte E und F sind in μl angegeben.

Zur RNA wurde anschließend jeweils 2 μl gDNA Wipeout Buffer hinzugefügt, um evtl. mit isolierte genomische DNA zu entfernen, damit diese die qRT-PCR Ergebnisse nicht verfälschen kann. Die so befüllten PCR-Tubes wurden nun in den Thermal Cycler T100 gestellt um den gDNA Wipeout Buffer bei 42 °C für 2 min reagieren zu lassen. Anschließend wurden pro Tube 6 μl Mastermix (s. Tabelle 17) hinzugegeben.

Tabelle 17: Komponenten mit Menge pro Probe für den Mastermix der cDNA- Synthese.

Mastermix Komponenten	Menge pro Probe
Reverse Transcriptase	1 μl
RT Buffer	4 μl
RT Primer Mix	1 μl

In einem weiteren Lauf (s. Tabelle 18) wurde die RNA von der reversen Transkriptase anhand des Primer Mix in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 18: Programmeinstellung für den Lauf für die reverse Transkription.

Temperatur [°C]	Dauer [min]
42	15
95	3

Danach wurde jede Probe mit 40 μl PCR-sauberem Wasser gemischt, um eine adäquat niedrige cDNA Konzentration für die qRT-PCR zu erhalten.

2.2.5 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Bei der PCR werden DNA-Sequenzen vermehrt und einer Messung zugänglich gemacht. Die PCR läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab: bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA aufgeschmolzen, danach folgt die Primer Anlagerung und die Amplifikation der Zielsequenz durch die DNA-Polymerase (49). So wird die Zielsequenz Zyklus für Zyklus vermehrt, wobei sie sich in der exponentiellen Phase der PCR theoretisch verdoppelt. Bei der qRT-PCR kann durch direkte Fluoreszenzmessung in Echtzeit diese exponentielle Phase erfasst werden (49). Die Fluoreszenz entsteht durch einen Farbstoff, der ins Reaktionsgefäß hinzugegeben wird. Hier wurde SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet (enthalten im Faststart Essential DNA Green Master). SYBR Green interkaliert in die Doppelstrang-DNA (50) und macht diese dadurch photometrisch messbar. Am Ende wird eine Schmelzkurven-Analyse angeschlossen, um zu sehen, ob die Vermehrung spezifisch für die Zielsequenz war und um die Vermehrung von Primerdimeren auszuschließen (49).

Mit der LightCycler 96 SW 1.1 Software wurde für jeden qRT-PCR Lauf ein individuelles Programm erstellt. Jeder Lauf bestand aus Vorinkubation, Drei-Schritt-Amplifikation, Schmelzkurve und Abkühlen (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Programmeinstellungen für die qRT- PCR Läufe.

Schritt		Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklus-anzahl
Vorinkubation		95	600	1
Drei-Schritt-Amplifikation	Denaturierung	95	10	40
	Anlagerung	Individuell je Primer	10	
	Amplifikation	72	Individuell je Primer	
Schmelzkurve		95	10	1
		65	60	
		97	1	
Abkühlen		37	30	1

Für jeden Primer wurde die Anlagerungstemperatur und Amplifikationsdauer der Drei-Schritt-Amplifikation individuell festgelegt (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Anlagerungstemperaturen, Amplifikationsdauer und Konzentration der Primer.

Gen	Anlagerungstemperatur [°C]	Amplifikationsdauer [s]	Primerkonzentration [nM]
<i>GAPDH</i>	60	15	500
<i>COL2A1</i>	65	15	500
<i>ACAN</i>	65	15	500
<i>COL1A1</i>	65	15	500
<i>SOX9</i>	60	15	500
<i>MMP13</i>	62	20	500

Das Reaktionsvolumen wurde auf 10 µl eingestellt und als Erfassungsformat SYBR Green I gewählt, die Einstellung für den verwendeten Faststart Essential DNA Green Master. Außerdem wurde für jeden Lauf ein Pipettierschema erstellt, mit dem festgelegt wurde wo welche Probe und wo die Negativkontrolle (PCR sauberes Wasser) in die 96 Well Platte pipettiert wurde. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert.

Nun wurde die LightCycler 96 Well Platte vorbereitet. Zuerst wurden in jedes Well 2,5 µl der Probe pipettiert, anschließend 7,5 µl des Mastermix (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Pipettierschema für den Mastermix für die qRT-PCR.

Komponente	Volumen [µl]
PCR sauberes Wasser	2
Primer	0,5
Faststart Essential DNA Green Master	5

Danach wurde die Platte mit LightCycler Versiegelungsfolie verschlossen und für 2 min mit 1500 U/min zentrifugiert, um den Inhalt auf den Boden der Platte zu bringen. Nun konnte die Platte im LightCycler eingelegt und das Programm gestartet werden. Die qRT-PCR lief sodann nach dem voreingestellten Programm ab.

2.2.6 Auswertung der Genexpressionsanalysen

2.2.6.1 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode

In der Realität liegt die optimale Phase mit exponentieller Vermehrung der Zielsequenz nur kurz und eher zu Beginn eines jeden PCR Laufs vor (51). Ganz zu Beginn eines PCR-Laufs kann die Amplifikation jedoch noch nicht gemessen werden, da die Fluoreszenz durch die Amplifikation noch unter der durch den Farbstoff hervorgerufenen Hintergrundfluoreszenz liegt. Erst wenn die Fluoreszenz durch die Amplifikation diese Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird sie messbar. Der erste Zyklus in dem das der Fall ist, ist der sogenannte „*threshold cycle*“ (C_T) (52). Hier wird die Messung des Zielgens vorgenommen, da die Amplifikation erstmals messbar wird, die Reaktion sich in der exponentiellen Phase befindet und somit die gemessene DNA-Menge proportional zur eingesetzten DNA-Menge ist (51).

Die Rohdaten aus der qRT-PCR sind jedoch qualitativ und deshalb nicht geeignet, um daraus quantitative Aussagen über den Versuch abzuleiten. Um Quantitative Aussagen treffen zu können gibt es verschiedene Auswertungsstrategien, z.B. die absolute Quantifizierung anhand einer Verdünnungsreihe, oder die relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode (51, 53).

Bei der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode (51, 53) werden die Rohdaten der qRT-PCR auf ein durch den Versuch nicht beeinflusstes „*housekeeping gene*“ (HKG), also ein internes Referenzgen, normalisiert:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

Hier wurde *GAPDH* als HKG verwendet. Anschließend werden die normalisierten Expressionsergebnisse von Tag 7 (Versuchsgruppe) zu den normalisierten Expressionsergebnissen von Tag 0 (Kontrollgruppe) in Beziehung gesetzt:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Versuchsgruppe}) - \Delta C_T(\text{Kontrollgruppe})$$

Der relative Expressionsunterschied ergibt sich dann aus der Formel:

$$\text{relativer Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode können systematische Fehler ausgeglichen werden, weil sie neben dem Zielgen immer auch das HKG mitbetreffen und sich durch die Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes aufheben (54).

2.2.6.2 Statistik

Die statistische Auswertung wurde vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie (IBE), LMU München, durchgeführt.

Die statistischen Analysen stützen sich, wie bei Grigull et al. (40) beschrieben, auf gemischte lineare Modelle, genauer: Random Intercept Models mit einem Random Intercept pro Patient_in. Als abhängige Variable wurde der dekadische Logarithmus der normalisierten relativen Genexpressionsdaten verwendet. Diese Analysen wurden mit der Prozedur MIXED des Statistical Analysis System SAS, Version 9.4 für Windows (SAS Institute, Cary, NC), durchgeführt.

Die graphische Darstellung der PCR-Daten erfolgte anhand von Boxplots (die Box reicht vom 25. bis zum 75. Perzentil; die Linie in der Box markiert den Median; die Whiskers reichen bis zum Minimum bzw. Maximum). Die p-Werte in den Grafiken wurden nach Bonferroni korrigiert.

Jede Box im Graph enthält die normalisierten qRT-PCR-Daten aus vier unabhängigen Experimenten (in Passage 4 aus drei unabhängigen Experimenten, bei den LD Gruppen aus einem Experiment). Dabei wurden aus jeder Versuchsgruppe zwei RNA-Proben genommen und diese jeweils als Triplikate in der qRT-PCR analysiert.

2.2.7 Histologie

2.2.7.1 Probengewinnung

Von den HD Hydrogelkulturen und den Pelletkulturen wurden jeweils am Ende einer Passage eine Probe pro Versuchsgruppe für die Histologie asserviert.

Die Probengewinnung aus Pellets für die Histologie geschah durch die möglichst trockene Überführung von je zwei Pellets in ein Gewebeprobeförmchen.

Für Histologieproben aus den HD Hydrogelkulturen wurde mit einem Einmalskalpell ein Streifen aus dem Bereich des Hydrogels mit dem größten Durchmesser geschnitten und in ein Gewebeprobeförmchen überführt.

Die Proben wurden nun für 30 min bei 4 °C in Sucroslösung (5 % Sucrose in PBS) inkubiert. Anschließend wurde die Sucroslösung verworfen, die Proben in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die gefrorenen Proben wurden in Alufolie Universal gewickelt und bei -20 °C gelagert.

2.2.7.2 Gefrierschnitte

Alle Gewebeschnitte wurden als 10 µm dicke Gefrierschnitte bei -20 °C am Kryostat Leica CM3050 gefertigt. Jeweils drei Schnitte wurden auf einen Objektträger Superfrost plus aufgezogen, für 10 min in Aceton fixiert und 20 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger zu jeweils zwei in Alufolie Universal gewickelt und bei -20 °C asserviert.

2.2.7.3 Safranin O/Lichtgrün Färbung

Safranin O ist ein kationischer Farbstoff, der sehr spezifisch an die negativ geladenen GAGs bindet (55). Dadurch färben sich bei der Safranin O/Lichtgrün Färbung die Proteoglykane in der EZM von hyalinem Knorpel rot und die restlichen Gewebeanteile grün.

Zum Färben wurden die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 0,75 % Safranin O und 0,02 % Lichtgrün gefärbt (Färbeschema s. Tabelle 22). Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und für 10 min bei 60 °C im Trockenschrank trocknen gelassen. Gelagert wurden die gefärbten Schnitte in Präparatekästen bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Tabelle 22: Färbeschema für die Safranin O/Lichtgrün Färbung

Lösung	Dauer	Vorgang
Safranin O 0,75 %	10 min	Färben
Aqua dest.	6 min	Differenzieren
Aqua dest.	6 min	Differenzieren
Aqua dest.	6 min	Differenzieren
Lichtgrün 0,02 %	10 sec	Färben
Essigsäure 1 %	8 sec	Differenzieren
Ethanol 100 %	8 sec	Differenzieren
Ethanol 100 %	8 sec	Differenzieren
Xylol	10 min	Entwässern
Xylol	10 min	Entwässern
Eukitt	-	Eindecken

2.2.7.4 Fotos

Fotos der gefärbten Schnitte wurden in verschiedenen Vergrößerungen am digitalen Lichtmikroskop Precipoint M8 angefertigt und mit Maßstab gespeichert.

2.2.7.5 Histologisches Assessment

Um die Färbung der histologischen Schnitte zu beurteilen, wurde der Bern score, wie von den Autor_innen beschrieben, verwendet (48). Hierbei wurde von drei unabhängigen Beobachter_innen die Beurteilung an verblindeten Präparaten eines Versuchs durchgeführt. Beurteilt wurden drei Kategorien:

- A: die Gleichmäßigkeit und Intensität der Safranin O Färbung
- B: der Abstand zwischen den Zellen
- C: die Zellmorphologie.

Dabei wurden pro Kategorie jeweils bis zu 3 Punkte vergeben, wobei eine hohe Punktzahl für eine gute Qualität des Neoknorpels spricht. Die Durchschnittswerte der drei Beobachter_innen wurden für jedes Präparat in jeder Kategorie (A, B, C), und als Summe der Kategorien (A+B+C) erfasst (s. Ergebnisse, Tabelle 23).

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der gewählten Zelldichte

Zur Validierung der gewählten Zelldichte für die HD Versuche wurden Chondrozyten der Passage 2 nach 7 Tagen als LD Kultur auf Polystyrol (LD Polystyrol), als LD Kultur auf BC Hydrogel (LD Hydrogel) oder in Pelletkultur (Pellet) auf die Genexpression von *COL2A1* und *COL1A1* untersucht.

Die LD Kulturen zeigten sowohl bei den OA als auch bei den non-OA Chondrozyten ein statistisch signifikant niedrigeres Niveau in der *COL2A1* Expression auf Polystyrol und auf Hydrogel im Vergleich zur Pelletkultur (s. Abbildung 9, A und B).

Die *COL1A1* Expression zeigte sich in der LD Polystyrolgruppe der OA und non-OA Chondrozyten signifikant am höchsten (s. Abbildung 9, C und D).

Des Weiteren war die *COL2A1/COL1A1*-Ratio in der LD Polystyrol- und der LD Hydrogelgruppe im Gegensatz zum Pellet sowohl bei den OA als auch bei den non-OA Chondrozyten signifikant vermindert (s. Abbildung 9, E und F).

Damit konnte in der LD Kultur nicht das chondrogene Potential der HD Kultur erreicht werden. Die in den folgenden Versuchen verwendete höhere Zelldichte kann als besser vergleichbar mit der Pelletkultur angenommen werden.

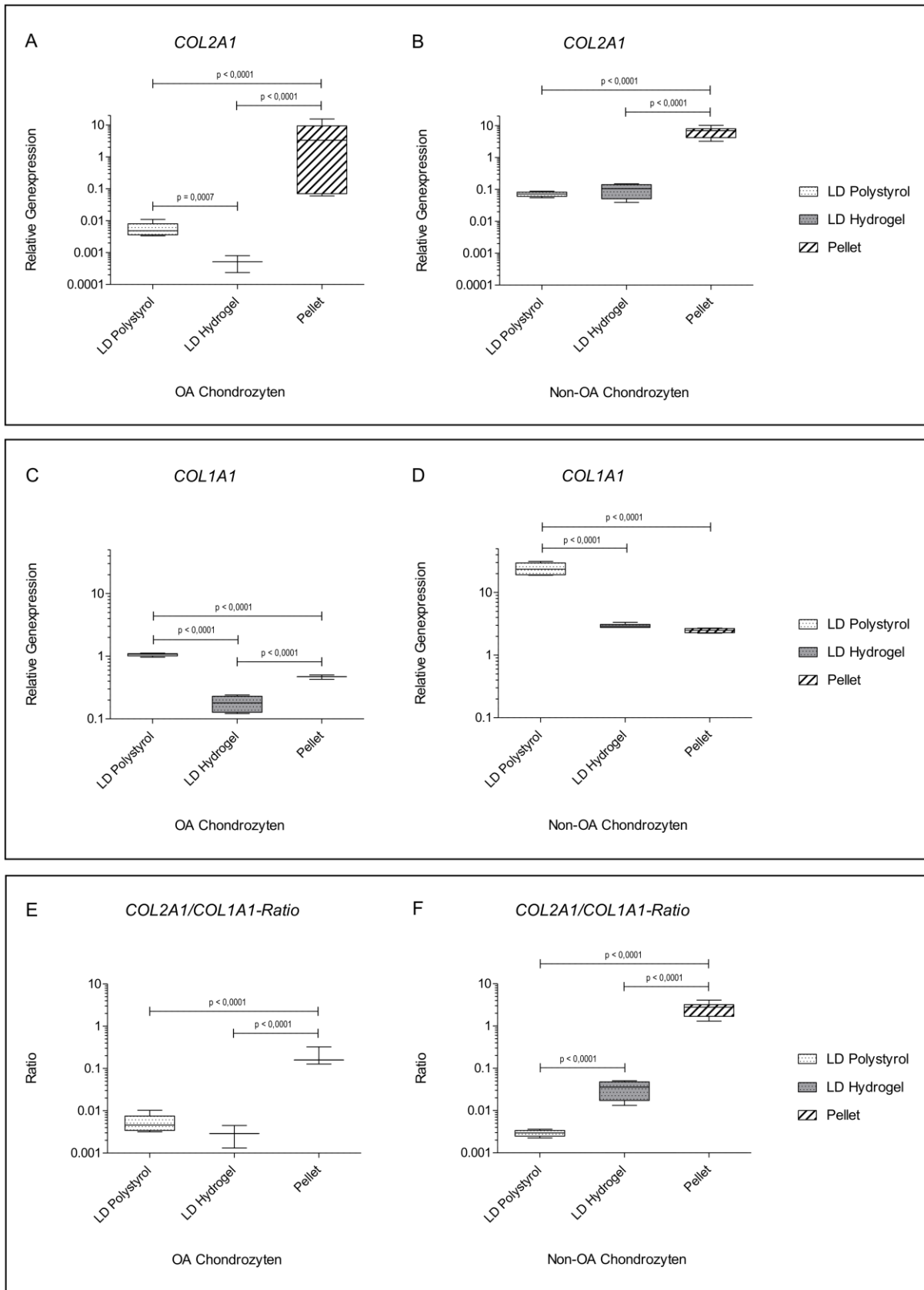


Abbildung 9: Validierungsversuch der gewählten Zelldichte für die HD Kultur. Relative Genexpression von Chondrozyten in Passage 2, normalisiert auf *GAPDH* und Tag 0 nach siebentägiger Kultivierung in niedriger Zelldichte auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. A: *COL2A1* Expression in OA Chondrozyten; B: *COL2A1* Expression in non-OA Chondrozyten; C: *COL1A1* Expression in OA Chondrozyten; D: *COL1A1* Expression in non-OA Chondrozyten; E: *COL2A1/COL1A1-Ratio* in OA Chondrozyten; F: *COL2A1/COL1A1-Ratio* in non-OA Chondrozyten. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

3.2 Genexpressionsanalyse

Nach siebentägiger Kultivierung in Passage 2, 3 oder 4 als HD Kultur auf Polystyrol, als HD Kultur auf BC Hydrogel oder in Pelletkultur wurde die Genexpression auf mRNA Ebene untersucht. Es wurde die Genexpression knorpelspezifischer Gene (*COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*) und Gene, die auf Dedifferenzierung und Degeneration hinweisen (*COL1A1*, *MMP13*), analysiert.

In den HD Versuchen zeigten weder die Kulturform (HD Polystyrol, HD Hydrogel, Pellet) noch die Passage einen statistisch signifikanten Effekt auf die *COL2A1* Expression von OA und non-OA Chondrozyten (s. Abbildung 10).

Es ließen sich in den Versuchsgruppen allenfalls Tendenzen einer Abnahme der *COL2A1* Expression über die Passagen hinweg erkennen.

Die *COL1A1* Expression war in OA Chondrozyten in Pelletkultur in allen Passagen signifikant niedriger als in der HD Kultur auf Polystyrol.

Bei den non-OA Chondrozyten zeigte sich dieser Unterschied erst ab Passage 3. Zwischen HD Kultur auf Polystyrol und HD Kultur auf Hydrogel zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der *COL1A1* Expression, unabhängig von der Zellform (OA oder non-OA Chondrozyten) und der Passage. Ebenso wenig zwischen der HD Kultur auf Hydrogel und der Pelletkultur (s. Abbildung 11).

Die *COL2A1/COL1A1*- Ratio war in der Pelletkultur sowohl gegenüber der HD Kultur auf Polystyrol als auch gegenüber der HD Kultur auf Hydrogel signifikant erhöht.

Dies zeigte sich in allen Passagen bei OA und non-OA Chondrozyten gleichermaßen. Ein signifikanter Unterschied zwischen HD Kultur auf Polystyrol und HD Kultur auf Hydrogel zeigte sich unabhängig von Zellform und Passage nicht (s. Abbildung 12).

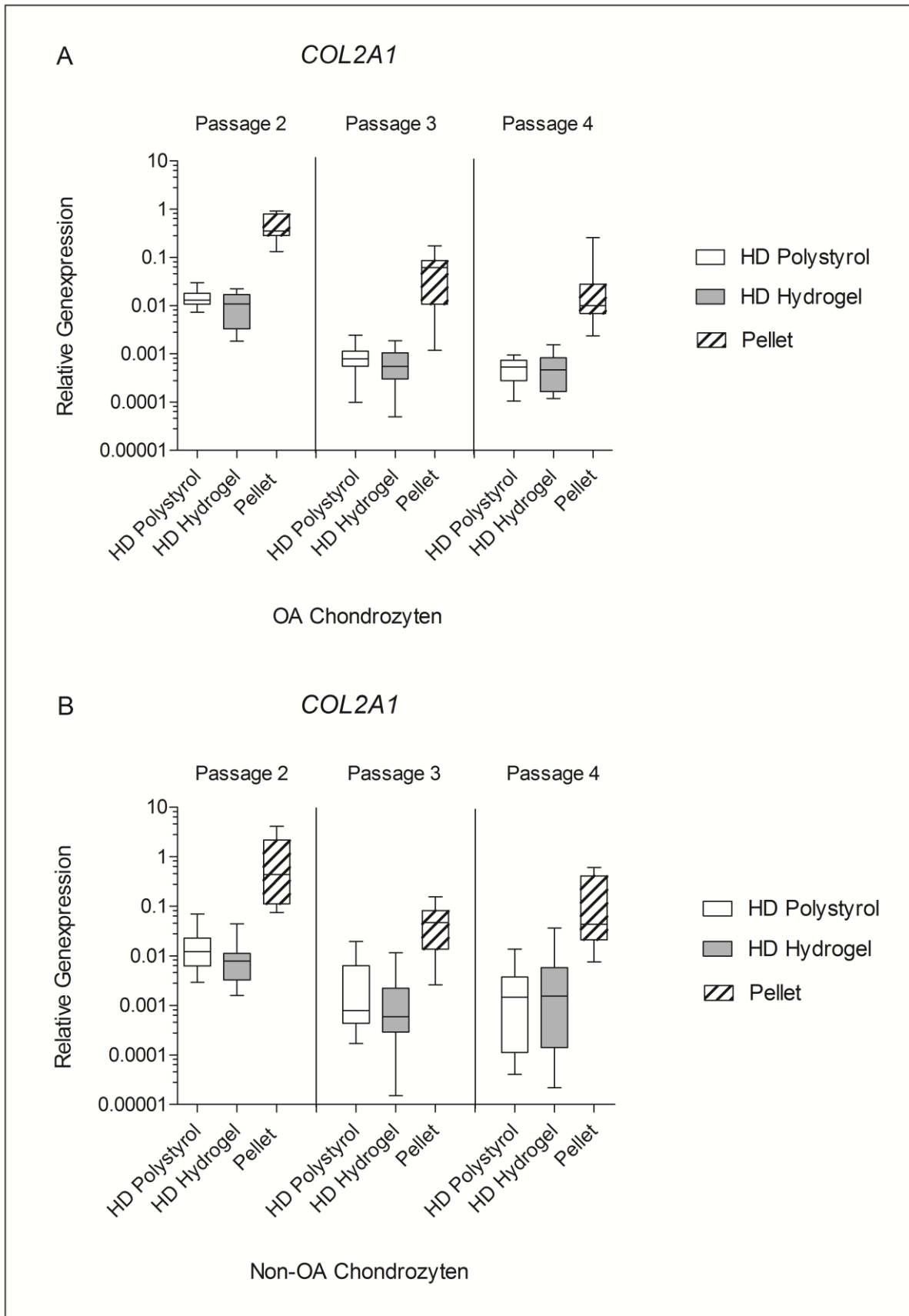


Abbildung 10: Relative Genexpression von *COL2A1* normalisiert auf *GAPDH* und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

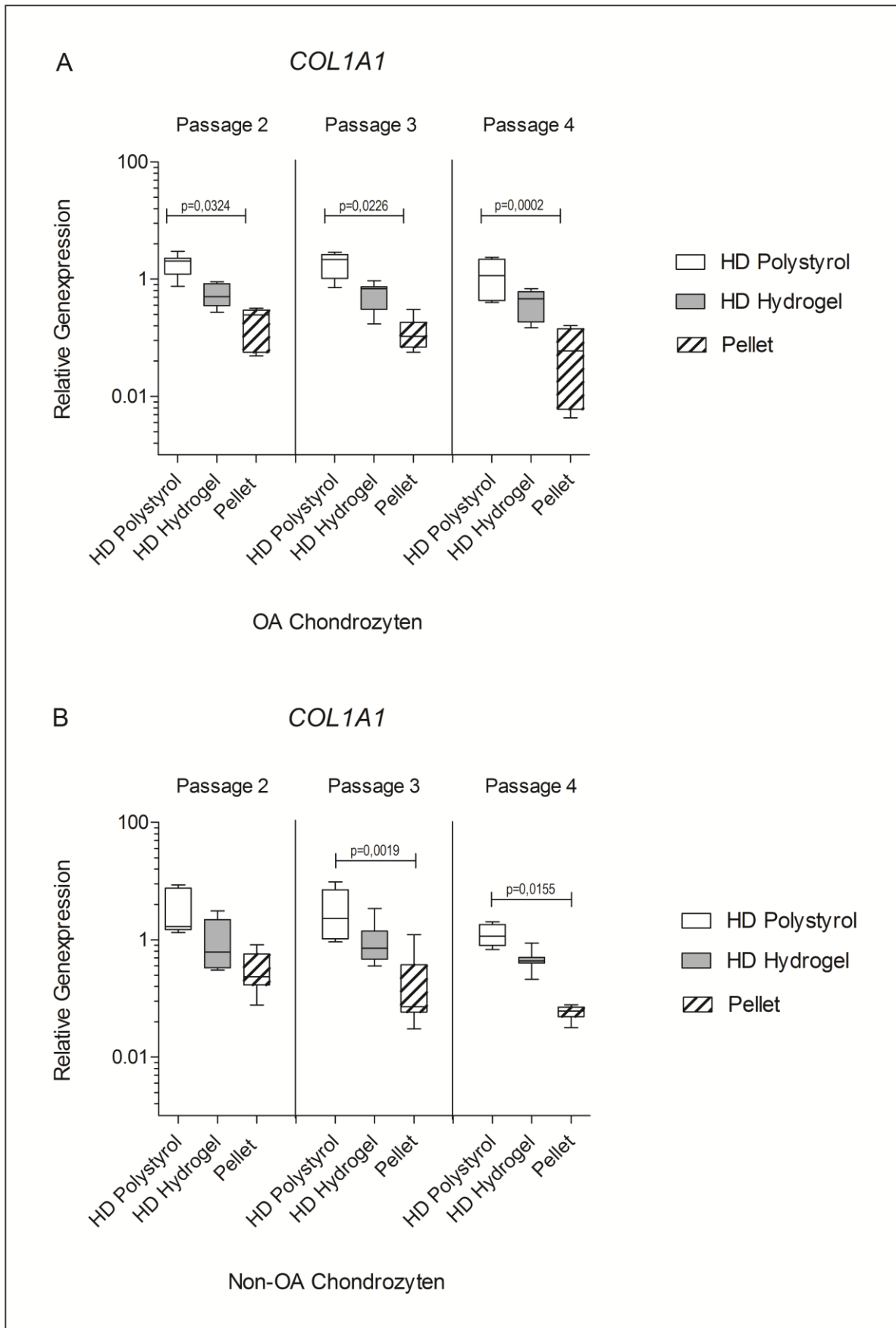


Abbildung 11: Relative Genexpression von *COL1A1* normalisiert auf *GAPDH* und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

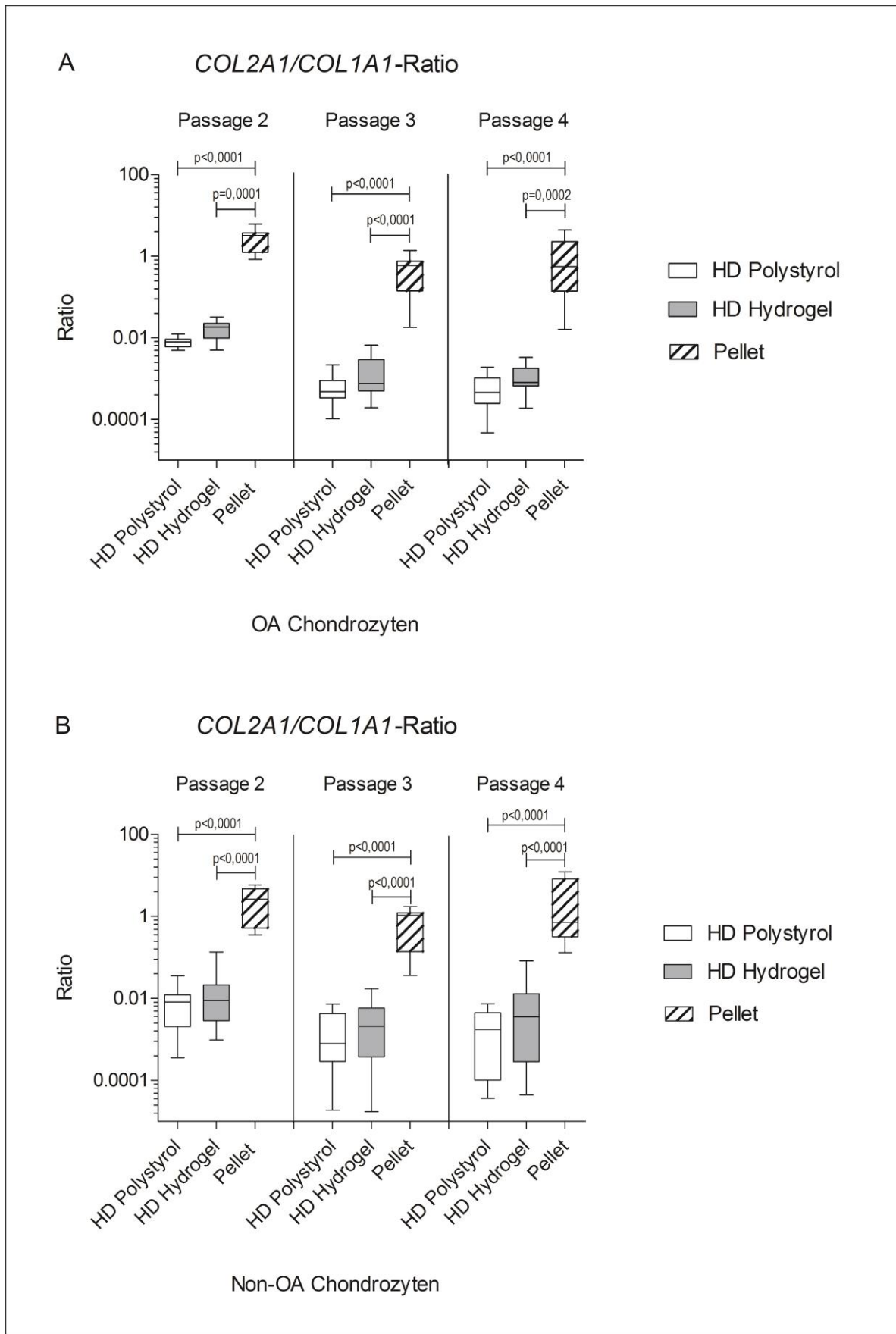


Abbildung 12: *COL2A1/COL1A1*-Ratio von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach sieben-tägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

Die *ACAN* Expression zeigte sich in den HD Versuchen sowohl in OA als auch in non-OA Chondrozyten durch alle Passagen unabhängig von der Kulturform unverändert (s. Abbildung 13).

Weder die Kulturform noch die Passage noch die Zellform zeigen einen statistisch signifikanten Effekt auf die *SOX9* Expression in den HD Versuchen (s. Abbildung 14).

Die *MMP13* Expression war in OA Chondrozyten in Passage 4 in der HD Kultur auf Polystyrol im Vergleich zur Pelletkultur signifikant erhöht. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HD Kultur auf Hydrogel und der Pelletkultur zeigte sich hier in keiner Passage.

In non-OA Chondrozyten war ab Passage 3 die *MMP13* Expression sowohl in der HD Kultur auf Polystyrol als auch in der HD Kultur auf Hydrogel im Vergleich zur Pelletkultur signifikant erhöht.

In beiden Zellformen war in keiner Passage ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HD Kultur auf Polystyrol und der HD Kultur auf Hydrogel detektierbar.

Hier zeigte sich der einzige statistisch signifikante Effekt, der zwischen verschiedenen Passagen erkennbar war: in non-OA Pellets der Passage 2 war im Vergleich zu non-OA Pellets der Passage 4 die *MMP13* Expression signifikant erhöht. (s. Abbildung 15).

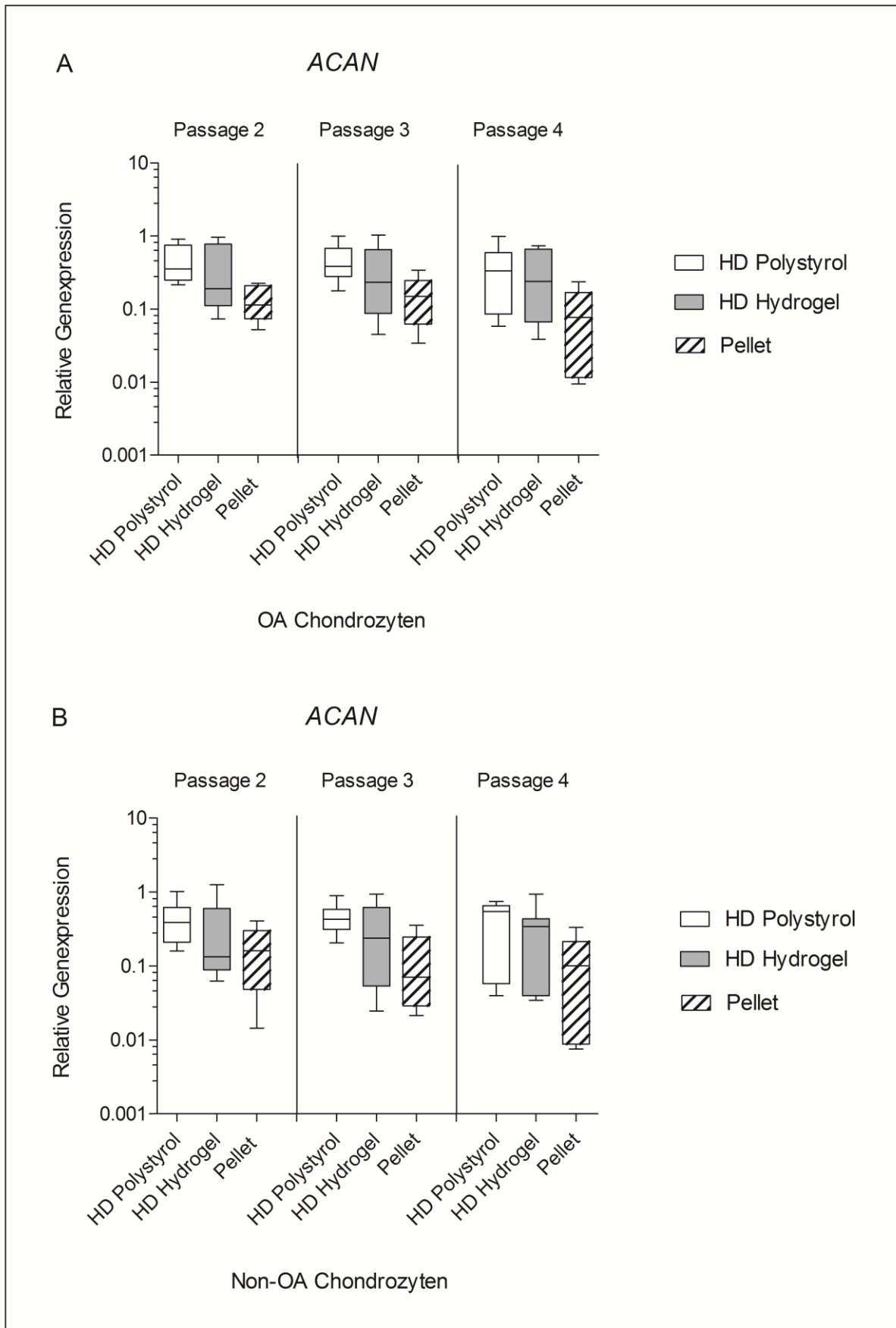


Abbildung 13: Relative Genexpression von *ACAN* normalisiert auf *GAPDH* und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

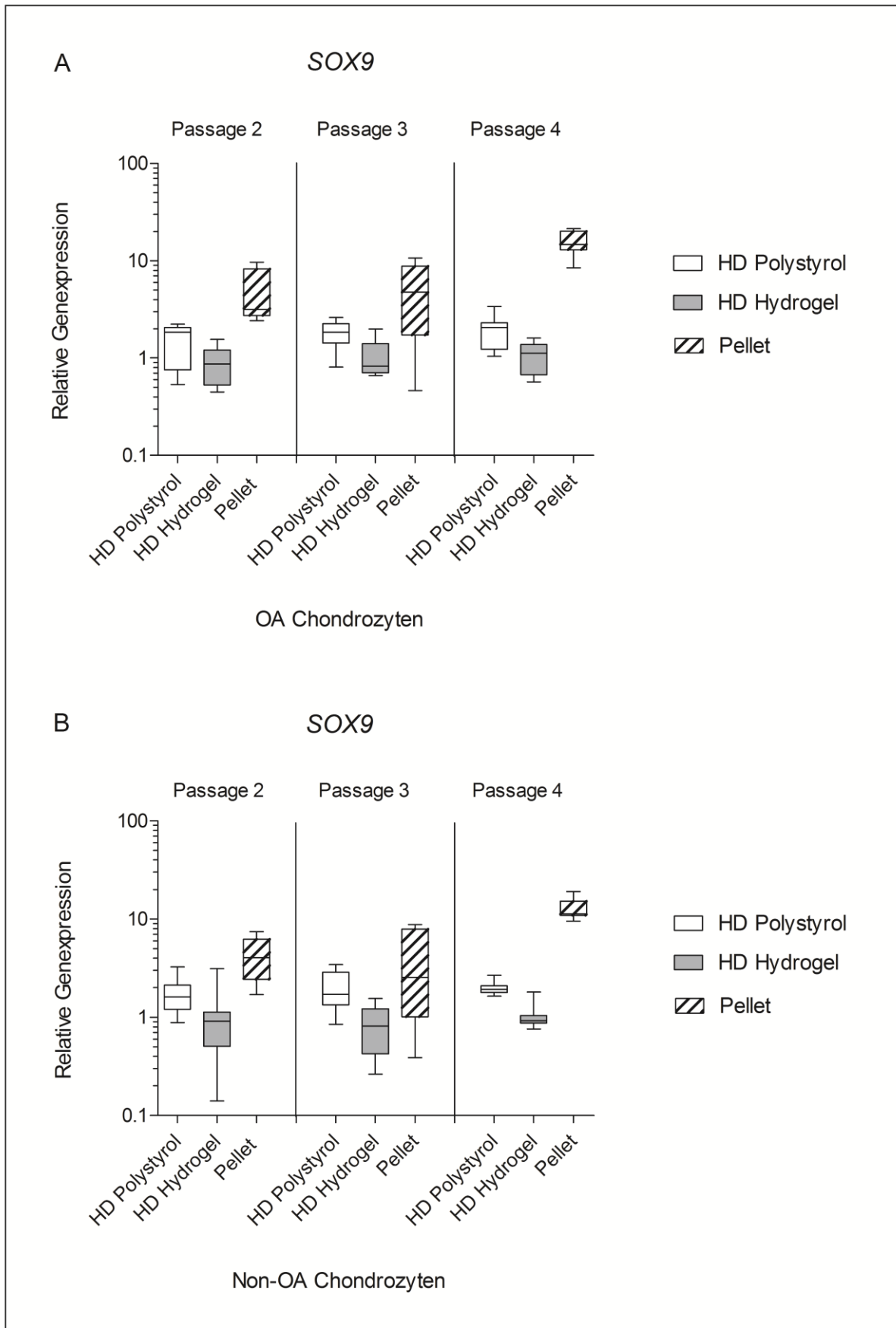


Abbildung 14: Relative Genexpression von SOX9 normalisiert auf GAPDH und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

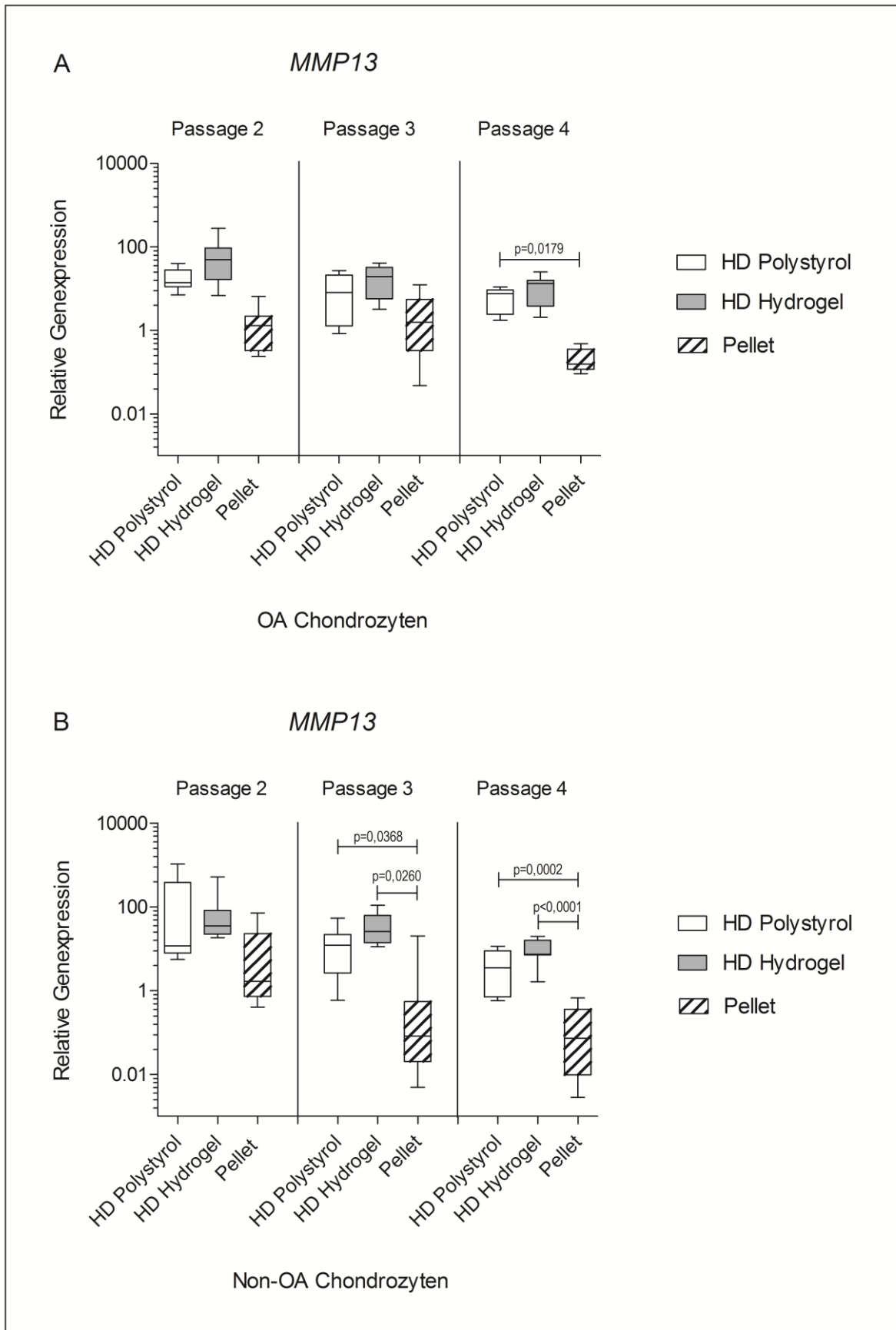


Abbildung 15: Relative Genexpression von *MMP13* normalisiert auf *GAPDH* und Tag 0 von A: OA Chondrozyten und B: Non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung auf Polystyrol, Hydrogel oder in Pelletkultur. Non-OA Pellet Passage 2 verglichen mit Non-OA Pellet Passage 4: $p = 0,0002$. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

Die OA und non-OA Chondrozyten reagierten, über alle Versuche hinweggesehen, in sehr ähnlichen Expressionsmustern auf die verschiedenen Kulturformen. Eine eindeutig bessere Redifferenzierung konnte in keiner der beiden Zellformen gefunden werden.

Die Passagierung zeigte, im Gegensatz zu den unterschiedlichen Kulturformen, kaum statistisch signifikante Effekte auf die Genexpression.

In allen Kulturformen konnte eine knorpelspezifische *COL2A1* Expression nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich in Hydrogelkulturen erhöhte *MMP-13* Expressionsmuster im Vergleich zur Pelletkultur. In Polystyrolkulturen zeigten sich sowohl signifikante *MMP13* als auch signifikante *COL1A1* Expressionserhöhungen im Vergleich zur Pelletkultur. Die beste Chondrozytendifferenzierung konnte in der Pelletkultur erreicht werden.

3.3 Histologie

Sowohl in der Pelletkultur als auch bei der HD Kultur auf BC Hydrogel zeigte sich eine Safranin O Färbung der EZM der Chondrozyten (s. Abbildung 16 und Abbildung 17). Diese war in der Pelletkultur zwischen den Zellen ausgeprägter als bei den Chondrozyten auf Hydrogel, wo sie nur sehr begrenzt perizellulär zu sehen war. Außerdem war die Safranin O Färbung in der Pelletkultur intensiver und gleichmäßiger, die Zellmorphologie runder und eher typisch für Chondrozyten als bei den Hydrogelkulturen.

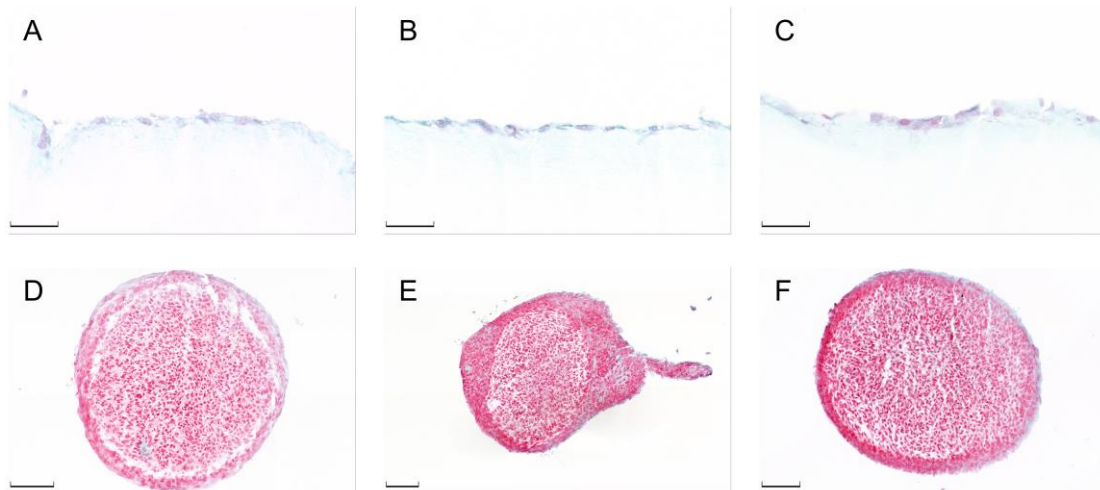


Abbildung 16: Safranin O/Lichtgrün-Färbung von Non-OA Chondrozyten auf Hydrogel (A-C) sowie in Pelletkultur (D-F). Passage 2 in A und D; Passage 3 in B und E; Passage 4 in C und F. Die Maßstabsbalken messen 50 µm in A-C und 100 µm in D-F.

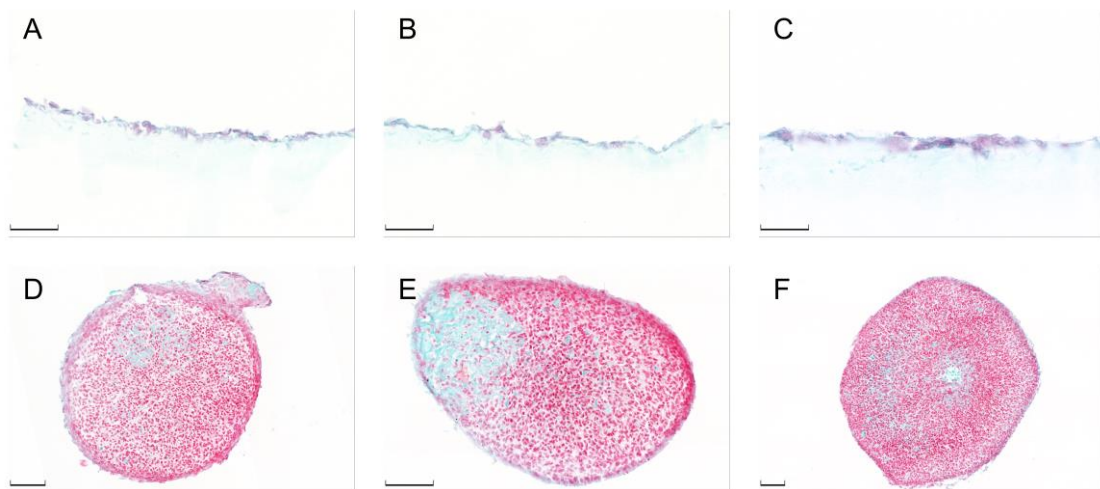


Abbildung 17: Safranin O/Lichtgrün-Färbung von OA Chondrozyten auf Hydrogel (A-C) sowie in Pelletkultur (D-F). Passage 2 in A und D; Passage 3 in B und E; Passage 4 in C und F. Die Maßstabsbalken messen 50 µm in A-C und 100 µm in D-F.

Insgesamt erreichten die Pelletkulturen einen höheren Bern Score als die Chondrozyten auf Hydrogel (s. Tabelle 23). Dies zeigte sich in allen Passagen bei OA und non-OA Chondrozyten gleichermaßen.

Zusammenfassend schienen die Chondrozyten in Pelletkultur einen hochwertigeren Neoknorpel mit mehr EZM zu bilden als die Chondrozyten auf Hydrogel.

Tabelle 23: Bern Score eines jeden Kriteriums und in Summe für Hydrogel und Pellets. Adaptiert aus Grigull et al. (40).

Präparat			A	B	C	Summe
OA	Hydrogel	Passage 2	1	2	2	5
		Passage 3	1	2	2	5
		Passage 4	1	2	2	5
	Pellet	Passage 2	2	3	3	8
		Passage 3	2	2	3	7
		Passage 4	2	3	3	8
Non-OA	Hydrogel	Passage 2	1	2	1	4
		Passage 3	1	2	2	5
		Passage 4	1	2	2	5
	Pellet	Passage 2	2	3	3	8
		Passage 3	2	3	3	8
		Passage 4	2	3	3	8

4 Diskussion

Da Arthrose nicht *ad integrum* geheilt werden kann, kommt der Prävention ein wichtiger Stellenwert zu. Der bisher vielversprechendste Ansatz zur Reparatur von Knorpeldefekten und Verhinderung nachfolgender Arthrose ist die MACT. Leider erreichen aber selbst bereits klinisch zugelassene Produkte bisher nicht das Differenzierungs-Niveau nativen Knorpelgewebes (9). Eine weitere Verbesserung der *in vitro* Kultivierungs-Methoden ist deshalb offensichtlich und dringend notwendig.

Im Bereich der Regenerativen Medizin sind BC Hydrogele als Matrizen zur Zellkultivierung aufgrund ihrer Biokompatibilität, Modifizierbarkeit und biomimetischen Eigenschaften ein Hoffnungsträger (23). Sie sind einfacher in der Handhabung als Pellets und können an viele verschiedene Bedürfnisse und Gegebenheiten angepasst werden.

Über erste Erfolge mit BC Hydrogelen in der Kultivierung von Chondrozyten ist bereits berichtet worden (24-26, 31). Soweit wir nach Prüfung der Literatur wissen, existiert jedoch bisher für die Kultivierung von humanen artikulären Chondrozyten noch kein Vergleich eines BC Hydrogels mit etablierten Kontrollgruppen, wie beispielsweise der Kultur auf Polystyrol oder der Pelletkultur.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass humane artikuläre Chondrozyten in HD Kultur von einer Kultivierung auf einem BC Hydrogel profitieren würden. Die Kombination aus der wässrigen Umgebung des BC Hydrogels und der HD Kultur könnte zu ähnlichen Ergebnissen führen wie eine 3D Kultur im Pellet, jedoch bei besserer Handhabbarkeit des Gels. Dabei sollte auch überprüft werden, ob sich Unterschiede zu den Kontrollgruppen zeigen würden. Außerdem sollte auf die Frage eingegangen werden, ob sich OA und non-OA Chondrozyten in ihrer Reaktion auf Redifferenzierungsstimuli unterscheiden würden.

Dazu wurden, nach Validierung der Zelldichte für die HD Kultur, OA und non-OA Chondrozyten für 7 Tage als HD Kultur auf einem BC Hydrogel kultiviert, mit HD Kultur auf Polystyrol und Pelletkultur verglichen und im Hinblick auf die Genexpression und die Produktion von EZM analysiert.

4.1 Validierung der gewählten Zelldichte

Zur Validierung der verwendeten Zelldichte wurde im Voraus ein verkürzter LD Versuch (Pellet, LD Hydrogel, LD Polystyrol) durchgeführt und auf Expression von *COL2A1* und *COL1A1* untersucht.

Im Validierungsversuch zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der *COL2A1* Expression in der LD Polystyrol- und der LD Hydrogelgruppe im Vergleich zur Pelletkultur (s. Ergebnisse, Abbildung 9).

In den darauffolgenden Versuchen in hoher Zelldichte war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar (s. Ergebnisse, Abbildung 10). Das im HD Versuch erzielte Ergebnis spricht für eine Verbesserung der Redifferenzierung durch die hohe Zelldichte. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, welche die hohe Zelldichte als Hauptfaktor für die chondrogene Differenzierung sehen (13, 15).

Deshalb wurde die hohe Zelldichte auch in der vorliegenden Arbeit, das chondrogene Potential betreffend, der niedrigen Zelldichte als überlegen angesehen.

Eine weitere Ursache für die Anpassung der Zelldichten bot die bessere Vergleichbarkeit der HD Gruppen mit der Pelletkultur. Denn in beiden Kulturformen (HD und Pellet) besteht die Möglichkeit zur Ausbildung vieler Zell-Zell-Kontakte, welche als wichtiger Stimulus der chondrogenen Differenzierung gilt (34).

4.2 Genexpressionsanalyse

Die Hypothese war, dass humane artikuläre Chondrozyten in HD Kultur von einer Kultivierung in der wässrigen Umgebung eines BC Hydrogels profitieren würden. Zur Kontrolle wurde diese Gruppe mit auf Polystyrol oder im Pellet kultivierten Chondrozyten verglichen. Außerdem sollte auf die Frage eingegangen werden, ob sich OA und non-OA Chondrozyten in ihrer Reaktion auf Redifferenzierungsstimuli unterscheiden.

Insgesamt waren die Chondrozyten in allen Kulturformen (HD Polystyrol, HD Hydrogel, Pellet) dazu fähig, das Hauptgen der chondrogenen Differenzierung *COL2A1* zu exprimieren (s. Ergebnisse, Abbildung 10). Es zeigten sich jedoch in der Hydrogelgruppe im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* Erhöhungen (s. Ergebnisse, Abbildung 15). In der Polystyrolgruppe waren im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* und *COL1A1* Erhöhungen zu verzeichnen (s. Ergebnisse, Abbildung 11 und Abbildung 15). Die Chondrozyten in Pelletkultur erreichten in diesem Setting die beste chondrogene Differenzierung, da sie im

Vergleich zur Polystyrol- und Hydrogelgruppe statistisch signifikant erhöhte Werte in der *COL2A1/COL1A1*-Ratio aufwiesen (s. Ergebnisse, Abbildung 12).

OA und non-OA Chondrozyten zeigten sehr ähnliche Expressionsmuster in Reaktion auf die Redifferenzierungsstimuli. Statistisch signifikante Unterschiede waren zwischen diesen beiden Gruppen nicht zu verzeichnen.

4.2.1 Einfluss der Pelletkultur

Allgemein wird die 3D Kultur der 2D Kultur bei der Redifferenzierung von Chondrozyten als überlegen betrachtet, weil sie zu einer knorpelspezifischeren Genexpression und zur Bildung einer höherwertigen EZM mit höherem GAG-Gehalt führt (14). Die Daten unserer Arbeit unterstützen diese These für die Pelletkultur, da diese die höchste *COL2A1/COL1A1*-Ratio erreichte (s. Ergebnisse, Abbildung 12). Des Weiteren war die Pelletkultur am erfolgreichsten in der Suppression von *COL1A1* und *MMP13*, die auf Dedifferenzierung und Matrixdegeneration hindeuten würden (s. Ergebnisse, Abbildung 11 und Abbildung 15). Die Pelletkultur gilt gemeinhin als Goldstandard für die Herausbildung des chondrogenen Phänotyps (38) und wird häufig verwendet, um nach *in vitro* Kultivierung von Chondrozyten den chondrogenen Phänotyp wieder zu stabilisieren (14, 20, 36).

Für niedrige Sauerstoffkonzentrationen sind positive Effekte auf die Genexpression humaner Chondrozyten beschrieben worden (56, 57). Durch die hohe Dichte der Pellets, und daraus resultierender erschwerter Gasdifffusion, könnte dieser Effekt auch bei normalen Sauerstoffkonzentrationen im Brutschrank entstehen, zumindest im Inneren der Pellets. Dadurch könnten die Chondrozyten auch in unserem Setting, abseits von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Interaktionen, in besonderem Maße von der Pelletkultur profitiert haben.

4.2.2 Einfluss der Kultur in hoher Zelldichte

Die HD Kultur bietet jedoch auch in der 2D Kultur die Möglichkeit, viele Zell-Zell-Kontakte auszubilden. Diese Zell-Zell-Kontakte gelten als der Mechanismus, der die HD Kultur zum wichtigsten Stimulus chondrogener Differenzierung macht (13, 15, 33, 34). Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, denn alle Gruppen (Pellet, HD Hydrogel, HD Polystyrol) exprimierten das wichtigste Gen der chondrogenen Differenzierung, *COL2A1*, ohne dass dabei statistisch signifikante Unterschiede detektierbar waren (s. Ergebnisse, Abbildung 10). Daher lässt sich schließen, dass

beide HD Gruppen, nicht nur die Chondrozyten auf BC Hydrogel, von der HD Kultur profitierten.

4.2.3 Einfluss der Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose

Neben Zell-Zell-Kontakten interagieren Zellen auch mit ihrer EZM und in Zellkultur auch mit der Matrix, auf der sie ausplattiert worden sind. Ist diese Matrix für das *in vitro* Wachstum der Zellen in ihrer Struktur nah genug an die natürliche EZM angelehnt, kann sie die Differenzierung der Zellen *via* Zell-Matrix-Interaktionen unterstützen (3). Da das Knorpelgewebe natürlicherweise einen sehr hohen Wasseranteil hat, sind Hydrogele als Matrix zur *in vitro* Kultivierung von Chondrozyten besonders attraktiv. Vor allem Hydrogele aus BC bieten sich aufgrund ihrer guten biokompatiblen Eigenschaften und vielfältigen Modifizierungsmöglichkeiten dafür an (23).

BC Hydrogele zeigten sich bereits geeignet für die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (32) und zur Kultivierung boviner und humaner Chondrozyten (31). Nasoseptale Chondrozyten konnten sogar bis zu 6 Wochen in einem BC Hydrogel kultiviert werden (26).

Diese Hydrogele wurden jedoch bezüglich Porengröße (24, 25) oder Schichtung (26) modifiziert, um eine 3D Kultur im Gel zu ermöglichen. Das Fehlen solcher Modifizierungen in unserem Setting könnte erklären, warum die Ergebnisse in der HD Hydrogelgruppe trotz der guten biomimetischen Eigenschaften der Matrix negativer ausfielen als erwartet.

Eine Studie zum Vergleich von sulfatierter und phosphorylierter BC mit unmodifizierter BC, identifizierte die unmodifizierte Form als die am besten geeignetste für das Wachstum humaner Chondrozyten (31). Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit ein unmodifiziertes BC Hydrogel gewählt, um in der 2D Kultur den Einfluss der Matrix an sich auf die Chondrozyten zu analysieren.

Denn auch wenn in unmodifizierter BC die Porengröße der Zellulosefibrillen zu klein ist um eine Migration der Zellen ins Gel zu ermöglichen, so unterstützen diese Nanoporen dennoch die Zellen in der Ausbildung von Kollagenfasern und der Bildung von EZM (23). Davon können Chondrozyten auch in 2D Kultur profitieren, da sie durch den Kontakt mit der porösen Oberfläche des BC Hydrogels stimuliert werden können. Ein weiterer Hinweis zur Erklärung der Ergebnisse der Hydrogelgruppe könnte in der Oberflächenladung des verwendeten BC Hydrogels liegen. Beim Vergleich unterschiedlich geladener Hydrogele ist gezeigt worden, dass neutrale Hydrogele und

solche mit niedriger Ladungsdichte die Redifferenzierung von humanen Chondrozyten am besten unterstützen (16).

Die Ergebnisse der Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Kulturen (HD Polystyrol, HD Hydrogel, Pellet) legen nahe, dass die Chondrozyten in unserem Setting von der HD Kultur mehr profitierten als von der Matrix. Dafür spricht, dass die Chondrozyten auf BC Hydrogel zwar *COL2A1* exprimierten, jedoch nicht statistisch signifikant aus den anderen Kulturformen (HD Polystyrol, Pellet) hervorstachen (s. Ergebnisse, Abbildung 10). Auch in der Suppression von Genexpression, die auf Degeneration und Dedifferenzierung hindeutet (*COL1A1*, *MMP13*), konnte sich die HD Kultur auf Hydrogel von der HD Kultur auf Polystyrol nicht statistisch signifikant abheben (s. Ergebnisse, Abbildung 11 und Abbildung 15). Diese Unterschiede waren in der LD Kultur teilweise noch sichtbar (s. Ergebnisse, Abbildung 9). Beides zusammen spricht für eine Verbesserung der Differenzierung in der HD Kultur, jedoch nicht nur auf dem BC Hydrogel.

Häufig werden Experimente mit verschiedenen Matrices in niedrigerer Zelldichte durchgeführt, was zur Überinterpretation des Einflusses der Materialien auf die Chondrozyten führen kann. Erst die optimierten Bedingungen für die Chondrozyten durch die HD Kultur erlauben eine genauere Analyse des Effekts der Matrix an sich auf die Chondrozyten.

Dies unterstreicht die Wichtigkeit des in dieser Arbeit angestellten Vergleichs zwischen dem BC Hydrogel und den Kontrollgruppen (Polystyrol, Pellet). So wird ermöglicht, den Einfluss des BC Hydrogels auf die Chondrozyten in den Kontext etablierter Kulturmethoden einzuordnen.

An dieser Stelle bedarf es weiterer Forschung, um die Interaktion der Chondrozyten mit dem BC Hydrogel besser zu verstehen. In einem weiteren Schritt wäre beispielsweise auch die Implementierung einer 3D Kultur im Gel interessant, inklusive Analyse von Migration und Proliferation der Zellen.

4.2.4 Vergleich zwischen OA und non-OA Chondrozyten

Beim Vergleich der OA und non-OA Chondrozyten in Reaktion auf die verschiedenen Kulturformen (HD Polystyrol, HD Hydrogel, Pellet) zeigten sich sehr ähnliche Expressionsmuster in beiden Zellformen. Daher lässt sich schließen, dass OA und non-OA Chondrozyten gleichermaßen zur Redifferenzierung fähig sind.

Auch in der Literatur sind solche Effekte beschrieben, z.B. zeigten OA Chondrozyten in einem Collagen I Gel im Vergleich zu Chondrozyten von jungen

Traumapatient_innen sehr ähnliche chondrogene Genexpressionsmuster (39). Durch die Analyse von Genexpressionsprofilen von OA Chondrozyten zeigte sich, dass das chondrogene Potential von OA Chondrozyten, im Vergleich mit non-OA Chondrozyten, nicht signifikant eingeschränkt ist (36). Eine weitere Studie bescheinigte OA Chondrozyten mit Hilfe einer Mikrosatelliten-Instabilitäts-Analyse genetische Stabilität in bis zu 29 Populationsdopplungen in Zellkultur (58), was wichtig für die Sicherheit in der klinischen Anwendung von OA Chondrozyten ist.

Dass die OA und non-OA Chondrozyten sich in der vorliegenden Arbeit gleichermaßen zur Redifferenzierung fähig zeigten, unterstreicht das Potential und die Verwendbarkeit von OA Chondrozyten in der Regenerativen Medizin. So könnte beispielsweise, langfristig gedacht, die MACT auch zum Wohle bereits von Arthrose betroffener Patient_innen eingesetzt werden. Weitere Forschung sollte hier Klarheit bringen, auch was die Fähigkeit solcher Zellprodukte aus OA Chondrozyten zur *in vivo* Integration ins umgebende Gewebe betrifft, die den Erfolg der MACT maßgeblich beeinflusst.

4.2.5 Passage-Effekte

Inwieweit die Fähigkeit zur Redifferenzierung bei Chondrozyten in höheren Passagen erhalten bleibt, ist umstritten. Manche Autor_innen sehen diese bis Passage 3 gegeben (59), andere berichten bis Passage 4 über Erfolge (13). Es wurde auch postuliert, dass die Kultur in hoher Dichte wichtiger für die chondrogene Differenzierung ist als die Dedifferenzierung während vorangegangener Passagierung (15). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine relevanten statistisch signifikanten Unterschiede aufgrund der Passage. Und obwohl sich Tendenzen einer Abnahme der *COL2A1* Expression und der *COL2A1/COL1A1*-Ratio über die Passagen zeigten, behielten alle Gruppen ihre Fähigkeit zur Redifferenzierung bis inklusive Passage 4 bei (s. Ergebnisse, Abbildung 10 und Abbildung 12). Dies stützt die These, dass Effekte der HD Kultur auf die Chondrozyten, die der vorangegangenen Dedifferenzierung unter bestimmten Umständen überschreiten können. Das eröffnet die Möglichkeit Chondrozyten über mehrere Passagen auf sehr hohe Zellzahlen zu vermehren, die dann wieder für die Redifferenzierung und Reimplantation zur Verfügung stehen. So könnte die gleiche oder eine höhere Zellzahl bei weniger primär isolierten Zellen erreicht werden, was helfen würde den Kollateralschaden durch die Entnahme zu minimieren.

4.2.6 Kultivierungsdauer

Die relativ kurze Kultivierungsdauer in unserem Versuchsaufbau könnte als Schwäche der Studie ausgelegt werden, denn häufig wird eine Dauer von 2 Wochen oder länger bevorzugt, um den Chondrozyten Zeit zur Redifferenzierung zu geben und um mehr EZM zu bilden (26, 38). Jedoch profitieren die Chondrozyten nicht unbedingt immer von einer Dauer von über einer Woche (60). Außerdem orientiert sich die Kultivierungsdauer von 7 Tagen an klinischen Zeitfenstern, um eine lange Immobilisierung der Patient_innen zu verhindern. Denn Immobilisierung führt zu degenerativen Veränderungen am Gelenkknorpel, mit Ausdünnung der Knorpelschicht auf den Gelenkflächen, Knorpelmatrix-Abbau, Kalzifizierung, verminderter Zellularität und Genexpressionsveränderungen (61, 62).

4.3 Histologie

Bei der Safranin O Färbung zeigte sich, dass OA und non-OA Chondrozyten sowohl in HD Kultur auf Hydrogel als auch in Pelletkultur EZM gebildet hatten (s. Ergebnisse, Abbildung 16 und Abbildung 17). Bei der Bewertung mittels Bern Score erreichten die Pelletkulturen jedoch höhere Werte als die Chondrozyten auf Hydrogel, unabhängig von Zellart und Passage (s. Ergebnisse, Tabelle 23). Morphologisch schienen die Chondrozyten in Pelletkultur einen hochwertigeren Neoknorpel mit mehr EZM zu bilden als die Chondrozyten auf Hydrogel.

Dies stützt die Aussage der Genexpressionsergebnisse, in denen auch die Pelletkulturen die beste Differenzierung erreichten. Auch dass sich über die Passagen und zwischen den Zellformen keine nennenswerten Unterschiede in der Bildung von EZM zeigten, deckt sich mit den Ergebnissen der Genexpression.

Der Bern Score ist ein visuelles Bewertungs-Verfahren, um *in vitro* entstandene Knorpelkonstrukte zu beurteilen (48). Er kann einen sehr guten Eindruck über die Güte der Knorpelprodukte verschaffen, da der dadurch ermittelte Punkt-Wert gut mit dem biochemisch ermittelten GAG-Gehalt in Pelletkulturen und einer computerbasierten Bewertung korreliert (48).

Allerdings wurde der Bern Score an und für 3D Kulturen entwickelt, weshalb die Aussagekraft für die 2D Kultur auf dem BC Hydrogel eingeschränkt sein könnte.

Da die direkte Messung von Proteinen meist methodisch sehr aufwändig und teuer ist, hat sich die stellvertretende Bestimmung der mRNA- Expression durchgesetzt (63). Diese kann sich, aufgrund posttranslationaler Modifikation oder unterschiedlicher

Halbwertszeiten von mRNA und Proteinen, mitunter aber auch deutlich von der Proteinebene unterscheiden (63). Ein direkter Vergleich ist also zumindest für die wichtigsten Parameter wünschenswert. In der vorliegenden Arbeit sollte dies durch immunhistochemische Analyse von Kollagen I und II erfolgen. Dies scheiterte jedoch an der zu hohen Hintergrundfärbung durch die BC Hydrogelmatrix, die eine Unterscheidung von Matrix zu positiv gefärbten Zellen unmöglich machte (Daten nicht gezeigt).

Stattdessen wurde der Bern Score verwendet, um die Färbung der Proteoglykane besser zu beurteilen und somit dem Zweck der Immunhistochemischen Analyse möglichst nahe zu kommen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden OA und non-OA Chondrozyten nach siebentägiger Kultivierung in Passage 2, 3 oder 4 als HD Kultur auf Polystyrol, als HD Kultur auf BC Hydrogel oder in Pelletkultur auf ihre chondrogene Differenzierung untersucht. Es wurde die Genexpression knorpelspezifischer Gene (*COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*) und Gene, die auf Dedifferenzierung und Degeneration hinweisen (*COL1A1*, *MMP13*), analysiert sowie eine histologische Beurteilung durchgeführt.

5.1 Zusammenstellung der Ergebnisse

Insgesamt waren die Chondrozyten in allen Kulturformen (HD Polystyrol, HD Hydrogel, Pellet) dazu fähig, das Hauptgen der chondrogenen Differenzierung, *COL2A1*, zu exprimieren. Es zeigten sich jedoch in der Hydrogelgruppe im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* Erhöhungen. In der Polystyrolgruppe waren im Vergleich zum Pellet statistisch signifikante *MMP13* und *COL1A1* Erhöhungen zu verzeichnen. Die Chondrozyten in Pelletkultur erreichten in diesem Setting die beste chondrogene Differenzierung, da sie im Vergleich zur Polystyrol- und Hydrogelgruppe statistisch signifikant erhöhte Werte in der *COL2A1/COL1A1*-Ratio zeigten. OA und non-OA Chondrozyten zeigten sehr ähnliche Expressionsmuster in Reaktion auf die Redifferenzierungsstimuli.

In der Safranin O Färbung zeigte sich, dass OA und non-OA Chondrozyten sowohl in HD Kultur auf Hydrogel als auch in Pelletkultur EZM gebildet hatten. Morphologisch schienen jedoch die Chondrozyten in Pelletkultur einen hochwertigeren Neoknorpel mit mehr EZM zu bilden als die Chondrozyten auf Hydrogel, was sich auch in einer höheren Punktzahl im Bern Score für die Pelletkulturen zeigte.

5.2 Beantwortung der Fragestellung

a) Profitieren humane artikuläre Chondrozyten in HD Kultur von einer Kultivierung auf einem BC Hydrogel?

In der vorliegenden Arbeit profitierten die Chondrozyten von der Kultivierung auf dem BC Hydrogel, da sie sich in ihrer *COL2A1* Expression nicht statistisch signifikant vom Goldstandard Pelletkultur unterschieden. Jedoch profitierten sie wahrscheinlich mehr von der HD Kultur, da sie sich in ihrem

Genexpressionsprofil auch nicht statistisch signifikant von der Negativkontrollgruppe auf Polystyrol abheben konnten.

b) Zeigt sich dabei ein Unterschied zu den Kontrollgruppen (Pelletkultur, HD Kultivierung auf Polystyrol)?

In der *COL2A1* Expression zeigten sich allenfalls tendenzielle Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturen. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich bei der *COL2A1/COL1A1*-Ratio erkennen, mit den höchsten Werten in der Pelletkultur. Ebenfalls statistisch signifikant im Vergleich zur Pelletkultur zeigten sich Erhöhungen von *MMP13* in der Hydrogelgruppe sowie *MMP13* und *COL1A1* Erhöhungen in der Polystyrolgruppe.

c) Zeigt sich dabei ein Unterschied zwischen OA und non-OA Chondrozyten?

OA und non-OA Chondrozyten zeigten sehr ähnliche Expressionsmuster in Reaktion auf die verschiedenen Kulturformen, sodass sich schließen lässt, dass in diesem Setting beide Zellarten gleichermaßen zur Redifferenzierung fähig waren.

5.3 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BC Hydrogele, aufgrund ihrer biomimetischen Eigenschaften und ihrer Modifikationsmöglichkeiten, Potential für den Bereich der Geweberekonstruktion haben. In der vorliegenden Arbeit blieb die Pelletkultur der HD Kultur auf BC Hydrogel jedoch, die Redifferenzierung und Bildung von EZM betreffend, überlegen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Vergleichs neuer Ansätze mit etablierten Systemen.

Publikationen

Daten dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

Grigull NP, Redeker JI, Schmitt B, Saller MM, Schönitzer V, Mayer-Wagner S. Chondrogenic Potential of Pellet Culture Compared to High-Density Culture on a Bacterial Cellulose Hydrogel. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(8). DOI: 10.3390/ijms21082785

Literaturverzeichnis

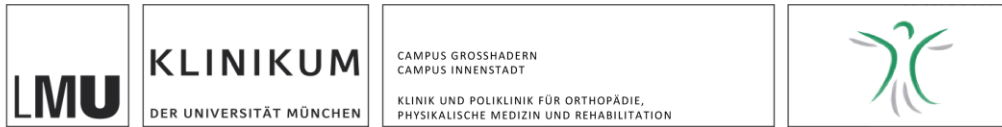
1. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in sports medicine*. 2017;36(3):413-25.
2. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*. 2009;1(6):461-8.
3. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 3):255-64.
4. Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC). Langfassung der Leitlinie "Gonarthrose". 2018.
5. Charlier E, Deroyer C, Ciregia F, Malaise O, Neuville S, Plener Z, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochemical pharmacology*. 2019;165:49-65.
6. Fuchs J, Rabenberg M, Scheidt-Nave C. [Prevalence of selected musculoskeletal conditions in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):678-86.
7. Conaghan PG, Kloppenburg M, Schett G, Bijlsma JW. Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(8):1442-5.
8. Filardo G, Andriolo L, Balboni F, Marcacci M, Kon E. Cartilage failures. Systematic literature review, critical survey analysis, and definition. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(12):3660-9.
9. Albrecht C, Tichy B, Nurnberger S, Hosiner S, Zak L, Aldrian S, et al. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis and cartilage*. 2011;19(10):1219-27.
10. Deng Z, Jin J, Zhao J, Xu H. Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses. *Stem cells international*. 2016;2016:9201492.
11. Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2009;191(4):325-38.
12. Caldwell KL, Wang J. Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthritis and cartilage*. 2015;23(3):351-62.
13. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell and tissue research*. 2002;308(3):371-9.
14. Caron MM, Emans PJ, Coolson MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and cartilage*. 2012;20(10):1170-8.
15. Francioli SE, Candrian C, Martin K, Heberer M, Martin I, Barbero A. Effect of three-dimensional expansion and cell seeding density on the cartilage-forming capacity of human articular chondrocytes in type II collagen sponges. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;95(3):924-31.
16. Yang JJ, Chen YM, Liu JF, Kurokawa T, Gong JP. Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces. *Tissue engineering Part A*. 2010;16(8):2529-40.
17. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*. 2016;98:1-22.

18. Redeker JI, Schmitt B, Grigull NP, Braun C, Buttner A, Jansson V, et al. Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):402.
19. Zhu G, Mayer-Wagner S, Schroder C, Woiczinski M, Blum H, Lavagi I, et al. Comparing effects of perfusion and hydrostatic pressure on gene profiles of human chondrocyte. *Journal of biotechnology*. 2015;210:59-65.
20. Francioli SE, Martin I, Sie CP, Hagg R, Tommasini R, Candrian C, et al. Growth factors for clinical-scale expansion of human articular chondrocytes: relevance for automated bioreactor systems. *Tissue engineering*. 2007;13(6):1227-34.
21. Jakob M, Demartean O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, et al. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 2001;81(2):368-77.
22. Hofinger M, Bertholdt G, Weuster-Botz D. Microbial production of homogeneously layered cellulose pellicles in a membrane bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 2011;108(9):2237-40.
23. Roman M, Haring AP, Bertucio TJ. The growing merits and dwindling limitations of bacterial cellulose-based tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2019;24:98-106.
24. Andersson J, Stenhamre H, Backdahl H, Gatenholm P. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;94(4):1124-32.
25. Ahrem H, Pretzel D, Endres M, Conrad D, Courseau J, Muller H, et al. Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants. *Acta biomaterialia*. 2014;10(3):1341-53.
26. Martinez Avila H, Feldmann EM, Pleumeekers MM, Nimeskern L, Kuo W, de Jong WC, et al. Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold supports neocartilage formation in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2015;44:122-33.
27. Yadav V, Paniliatis BJ, Shi H, Lee K, Cebe P, Kaplan DL. Novel in vivo-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(18):6257-65.
28. An SJ, Lee SH, Huh JB, Jeong SI, Park JS, Gwon HJ, et al. Preparation and Characterization of Resorbable Bacterial Cellulose Membranes Treated by Electron Beam Irradiation for Guided Bone Regeneration. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(11).
29. Basu P, Saha N, Alexandrova R, Andonova-Lilova B, Georgieva M, Miloshev G, et al. Biocompatibility and Biological Efficiency of Inorganic Calcium Filled Bacterial Cellulose Based Hydrogel Scaffolds for Bone Bioengineering. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12).
30. Feil G, Horres R, Schulte J, Mack AF, Petzoldt S, Arnold C, et al. Bacterial Cellulose Shifts Transcriptome and Proteome of Cultured Endothelial Cells Towards Native Differentiation. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2017;16(9):1563-77.
31. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 2005;26(4):419-31.
32. Yadav V, Sun L, Panilaitis B, Kaplan DL. In vitro chondrogenesis with lysozyme susceptible bacterial cellulose as a scaffold. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015;9(12):E276-88.

33. Cigan AD, Roach BL, Nims RJ, Tan AR, Albro MB, Stoker AM, et al. High seeding density of human chondrocytes in agarose produces tissue-engineered cartilage approaching native mechanical and biochemical properties. *Journal of biomechanics*. 2016;49(9):1909-17.
34. Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(1):166-74.
35. Rai MF, Rachakonda PS, Manning K, Palissa C, Sittinger M, Ringe J, et al. Molecular and phenotypic modulations of primary and immortalized canine chondrocytes in different culture systems. *Research in veterinary science*. 2009;87(3):399-407.
36. Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittinger M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(5):R133.
37. Islam A, Fossum V, Hansen AK, Urbarova I, Knutsen G, Martinez-Zubiaurre I. In vitro chondrogenic potency of surplus chondrocytes from autologous transplantation procedures does not predict short-term clinical outcomes. *BMC musculoskeletal disorders*. 2019;20(1):19.
38. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *Journal of anatomy*. 2004;205(3):229-37.
39. Jeyakumar V, Halbwirth F, Niculescu-Morzsza E, Bauer C, Zwickl H, Kern D, et al. Chondrogenic Gene Expression Differences between Chondrocytes from Osteoarthritic and Non-OA Trauma Joints in a 3D Collagen Type I Hydrogel. *Cartilage*. 2017;8(2):191-8.
40. Grigull NP, Redeker JI, Schmitt B, Saller MM, Schonitzer V, Mayer-Wagner S. Chondrogenic Potential of Pellet Culture Compared to High-Density Culture on a Bacterial Cellulose Hydrogel. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(8).
41. Dunda SE, Ranker M, Pallua N, Machens HG, Ravichandran A, Schantz JT. [In Vitro and In Vivo Biocompatibility of a Novel, 3-Dimensional Cellulose Matrix Structure]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 2015;47(6):378-83.
42. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):Research0034.
43. Varas L, Ohlsson LB, Honeth G, Olsson A, Bengtsson T, Wiberg C, et al. Alpha10 integrin expression is up-regulated on fibroblast growth factor-2-treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential. *Stem cells and development*. 2007;16(6):965-78.
44. Pauly S, Klatter F, Strobel C, Schmidmaier G, Greiner S, Scheibel M, et al. Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff. *European cells & materials*. 2010;20:84-97.
45. RTPrimerDB. RTPrimerDB ID 309 2002 [Available from: http://www.rtpimerdb.org/assay_report.php?assay_id=309].

46. Hong H, Park YK, Choi MS, Ryu NH, Song DK, Suh SI, et al. Differential down-regulation of COX-2 and MMP-13 in human skin fibroblasts by glucosamine-hydrochloride. *Journal of dermatological science*. 2009;56(1):43-50.
47. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
48. Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, et al. Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue engineering*. 2006;12(8):2141-9.
49. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120-6.
50. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*. 2004;32(12):e103.
51. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line; 2004. p. 87-112.
52. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods in enzymology*. 2011;500:99-109.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
54. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 2004;01-2004:92-5.
55. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry*. 1985;82(3):249-55.
56. Foldager CB, Nielsen AB, Munir S, Ulrich-Vinther M, Soballe K, Bunger C, et al. Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes. *Acta orthopaedica*. 2011;82(2):234-40.
57. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O. Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell transplantation*. 2008;17(8):987-96.
58. Neri S, Mariani E, Cattini L, Facchini A. Long-term in vitro expansion of osteoarthritic human articular chondrocytes do not alter genetic stability: a microsatellite instability analysis. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(10):2579-85.
59. Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Redeker JI, Schmitt B, Buettner A, et al. Scaffold-free 3D cellulose acetate membrane-based cultures form large cartilaginous constructs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2011;5(2):151-5.
60. Gavenis K, Schmidt-Rohlfing B, Mueller-Rath R, Andereya S, Schneider U. In vitro comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2006;42(5-6):159-67.
61. Nomura M, Sakitani N, Iwasawa H, Kohara Y, Takano S, Wakimoto Y, et al. Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(5):727-36.
62. Ni GX, Zhou YZ, Chen W, Xu L, Li Z, Liu SY, et al. Different responses of articular cartilage to strenuous running and joint immobilization. *Connective tissue research*. 2016;57(2):143-51.
63. Fu N, Drinnenberg I, Kelso J, Wu JR, Pääbo S, Zeng R, et al. Comparison of protein and mRNA expression evolution in humans and chimpanzees. *PloS one*. 2007;2(2):e216.

Anhang



Klinikum der Universität München • Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
Physikalische Medizin und Rehabilitation • Marchioninstr. 15 • 81377 München

Direktor der Klinik
Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Telefon + 49 (0)89 4400 - 72760
Telefax + 49 (0)89 4400 - 78881

Ellen.Rueger@med.uni-muenchen.de

Sekretariat: Frau Ellen Rüger

Postanschrift:
Marchioninstr. 15
81377 München

München, 31.03.2020

Patienteninformation/Einwilligung

Name des Teilnehmers _____

Teilnehmer-Nr.: _____

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen einer Untersuchungsstudie bei meiner Operation entnommene und zu verwerfende Gewebeproben analysiert werden. Dadurch entstehen keine zusätzlichen Risiken. Die Proben werden verblindet bearbeitet, die Kennzeichnung erfolgt über eine fortlaufende numerische Codierung. Beim Umgang mit den Daten werden die Grundsätze des Datenschutzes beachtet. Die Verwendung der Daten erfolgt ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken, und Sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser klinischen Prüfung werden Sie nicht namentlich genannt. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden Ihre Proben und die gespeicherten Daten nicht für die Studie verwendet bzw. die Proben vernichtet.

Mit der Verwendung von Gewebeproben im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

Ort, Datum

(Unterschrift des Patienten)

Freiwilligkeit der Untersuchungsstudie

Die Teilnahme an dieser Untersuchungsstudie ist absolut freiwillig. Wenn Sie die Teilnahme ablehnen oder Ihre Einwilligung während der Untersuchungsstudie zurückziehen, entstehen dadurch für Sie keine Nachteile.

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmars Jansson
Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts.
Vorstand: Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Karl-Walter Jauch (Vorsitz), Kaufmännischer Direktor: Gerd Koslowski,
Pflegedirektorin: Helle Dokken, Vertreter der Medizinischen Fakultät: Prof. Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel (Dekan)
Institutionskennzeichen: 260 914 050, Umsatzsteuer-Identifikationsnummer gemäß §27a Umsatzsteuergesetz: DE 813 536 017

Abbildung Anhang 1: Muster des Einwilligungsbogens für eine Knorpelspende der Patient_innen bei Kniegelenksersatz.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Professor Susanne Mayer für die Überlassung des Themas, die geduldige Betreuung und stetige Unterstützung.

Danke auch an Professor Matthias Schieker und Dr. Dipl. Ing. Christian Schröder als Mitglieder meiner Betreuungskommission im Rahmen des FöFoLe-Promotionsprogrammes.

Bärbel Schmitt und Julia Redeker möchte ich sehr herzlich danken für die sorgfältige und gewissenhafte Einarbeitung und die beständige Betreuung im Labor.

Der LMU München danke ich für den Ausbau des Kolloquiums für Promovierende im medizinischen Bereich durch das FöFoLe-Promotionsprogramm, die bewilligten Fördergelder und die wertvollen Fortbildungen.

Der Firma Xellutec danke ich für die großzügige Überlassung der BC Hydrogel Zellkulturplatten.

Dem Team im Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik danke ich für die herzliche Aufnahme, die gute Stimmung des Zusammenhalts und die motivierenden Ermunterungen. Besonderer Dank gilt hier Natalia Cabeza für ihre Hilfe in der Zellkultur und Sandra Haßelt für ihre Expertise und ihren Rat in der Histologie.

Dr. Veronika Schönitzer und Dr. Maximilian Saller danke ich für die Anregungen sowie Letzterem für die Mitbegutachtung der Proben für den Bern Score.

Für seine dauerhafte und tatkräftige Unterstützung in Belangen der Statistik danke ich Dr. Alexander Crispin vom IBE München sehr herzlich.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Kolleg_innen der endoprothetischen Chirurgie und der Rechtsmedizin für die Zusammenarbeit und für die Knorpelproben sowie bei allen Patient_innen die zu spenden bereit waren.

Danke an alle die Stunden mit mir in der Bibliothek zugebracht haben, mir mit Schreib-Tipps oder Hinweisen zu geschlechtergerechter Sprache geholfen haben oder sich Stunden mit Korrekturlesen um die Ohren geschlagen haben.

Der unbestreitbar am tiefsten empfundene Dank gilt meiner Familie, meinen Freund_innen und meinem Partner. Danke für eure Liebe, eure bedingungslose Unterstützung und euren Glauben an mich, nicht nur während des Studiums und der Dissertation, sondern immer auch weit darüber hinaus.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Grigull, Nele Pascale

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einflüsse einer Hydrogelmatrix aus bakterieller Zellulose auf humane artikuläre Chondrozyten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Leipzig, 06.12.2021

Ort, Datum

Nele Grigull

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand