

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Verwendung biomimetischer Mikroadhäsionsflächen zur
Herstellung spezifischer Zellgeometrien humaner
osteoarthritischer Chondrozyten zur Phänotyp-Modulation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schopf, geb. Buck, Franziska Karoline

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 30.09.2020

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	i
II Abbildungsverzeichnis	iv
III Tabellenverzeichnis	vii
IV Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des menschlichen Kniegelenks	1
1.2 Hyaliner Gelenkknorpel	3
1.3 Gelenkfläche: Die superfizielle Zone	8
1.4 Osteoarthrose	12
1.4.1 Osteoarthrose allgemein	12
1.4.2 Osteoarthrose auf zellulärer Ebene	14
1.5 Kollagene	17
1.5.1 Kollagene allgemein	17
1.5.2 Kollagene und ihre Bedeutung im hyalinen Gelenkknorpel.....	18
1.6 Bisheriger Therapiemöglichkeiten bei Osteoarthrose-erkrankten Kniegelenken	20
1.7 Bedeutung der Zellform	21
1.8 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Spenderkollektiv	24
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.4 Gerätschaften.....	27
2.1.5 Software	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Aufbereitung der Gelenkknorpel-Proben	29
2.2.2 Chondrozytenfärbung.....	30
2.2.2.1 Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM)	30
2.2.2.2 Propidiumiodid (PI).....	31
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Zellorganisation ...	31
2.2.4 Enzymatischer Knorpeldisc-Verdau.....	35
2.2.5 Ermittlung der vitalen Chondrozytenanzahl	36
2.2.6 Analyse der Zellgeometrie.....	38
2.2.6.1 Analysesoftware ImageJ	38
2.2.6.2 Shape Deskriptoren.....	38
2.2.6.2.1 Aspect Ratio	39
2.2.6.2.2 Roundness	40
2.2.6.2.3 Circularity	41
2.2.6.2.4 Solidity	42

Inhaltsverzeichnis

2.2.7 Veränderung der Zellgeometrie durch das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen (CYTOOchips)	43
2.2.8 mRNA-Extraktion	47
2.2.9 mRNA-Messung mit dem NanoDrop ND-1000	49
2.2.10 Anpassung der Methoden bei Verwendung von Mikroadhäsionsflächen	51
2.2.11 mRNA-Umschreibung in cDNA	54
2.2.12 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Quantitative real time polymerase chain reaction - qRT-PCR)	56
2.2.13 Auswertung der qRT-PCR-Daten	62
2.3 Statistische Auswertung	64
3 Ergebnisse	65
3.1 Analyse und Kontrolle der Zellgeometrie superfizieller Kniegelenkschondrozyten	65
3.1.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten im humanen hyalinen Kniegelenksknorpel	67
3.1.2 Verlust der Zellmorphologie nach enzymatischer Chondrozyten-Isolation aus humanen hyalinen Kniegelenksknorpel	75
3.1.3 Verwendung geometrisch definierter Mikro-Adhäsionsflächen zur Kontrolle der geometrischen Zellmorphologie superfizieller, isolierter Chondrozyten	83
3.1.3.1 Vergleich der Zellgeometrien superfizieller Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel mit superfiziellen, isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen	83
3.1.3.2 Vergleich von superfiziellen Chondrozyten mit einer elliptisch- geometrischen Zellmorphologie („Strings“, „H-Shape“) mit superfiziellen Chondrozyten mit einer rundlich-geometrischen Zellmorphologie („Diffus“, „O-Shape“)	90
3.2 Relative Kollagen mRNA-Genexpression isolierter, superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen	102
3.2.1 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen isolierter, superfizieller Chondrozyten in Abhängigkeit der räumlichen Organisation des hyalinen Kniegelenksknorpels	102
3.2.2 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen von isolierten, superfiziellen Chondrozyten innerhalb der ursprünglichen räumlichen Organisationsformen	109
3.2.3 Relative Kollagen mRNA-Expression isolierter, superfizieller Chondrozyten mit microengineerten Zellgeometrien	116
3.3 Analyse der relativen Kollagen mRNA-Expression im Zusammenhang mit der Ausprägung zellgeometrischer Charakteristika von superfiziellen Chondrozyten	122
3.3.1 Analyse von superfiziellen Chondrozyten im Gewebe	122
3.3.2 Analyse von superfiziellen, isolierten Chondrozyten mit geometrisch- kontrollierter Zellmorphologie	125
4 Diskussion	127

4.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten aus hyalinem Kniegelenksknorpel.....	127
4.1.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten in situ im hyalinen Kniegelenksknorpel	127
4.1.2 Analyse der Zellgeometrie superfizieller isolierter Chondrozyten.....	133
4.1.3 Vorüberlegungen zu dem Aufbringen von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf spezifische Mikroadhäsionsflächen.....	135
4.1.4 Vergleich der zellgeometrischen Eigenschaften von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit superfiziellen Chondrozyten im Gewebe	136
4.2 Analyse der relativen mRNA-Expression von superfiziellen isolierten Chondrozyten aus hyalinem Kniegelenksknorpel	140
4.2.1 Relative Kollagen mRNA-Expression von superfiziellen, isolierten Chondrozyten mit definierten räumlichen Organisationsformen	140
4.2.2 Relative Kollagen mRNA Expression von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen	145
4.3 Zusammenfassender Vergleich der zellgeometrischen und genotypischen Eigenschaften superfizieller Chondrozyten	148
5 Zusammenfassung.....	153
6 Anhang	155
6.1 Protokolletablierung zur Extraktion der mRNA von Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen	155
6.2 Analyse superfizieller isolierter Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen	155
6.3 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen	158
7 Literaturverzeichnis	160
8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	173

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anatomie des humanen rechten Kniegelenks mit Bändersystem und Mensiken.....	2
Abb. 2 Histologische und schematische Darstellung des hyalinen Gelenkknorpels	5
Abb. 3 Zonale Ausrichtung der Chondrozyten entlang der Kollagen-Arkaden. ..	6
Abb. 4 Aufbau der extrazellulären Matrix.....	7
Abb. 5 Verschiedene Zellmuster der superfiziellen Zone im humanen Kniegelenkknorpel	10
Abb. 6 „Doublestrings“ als Ausdruck degenerativer Veränderungen der superfiziellen Zone im humanen Kniegelenkknorpel	11
Abb. 7 Makroskopisch sichtbare Veränderung des humanen Kniegelenkknorpels im Verlauf der OA.	13
Abb. 8 Modell der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten im humanen Kniegelenk bei Progression der Osteoarthritis	15
Abb. 9 Planare Darstellung des Calcein-Moleküls.....	30
Abb. 10 Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskops.....	32
Abb. 11 Mosaikaufnahme einer superfiziellen Knorpeldisc.....	34
Abb. 12 Neubauer-Zählkammer	36
Abb. 13 Beispielhafte Zelle mit Darstellung einer Ellipse	39
Abb. 14 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Aspect Ratio“	39
Abb. 15 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Roundness“	40
Abb. 16 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Circularity“	41
Abb. 17 Beispielhafte Darstellung einer konvexen Fläche und der dazugehörigen konvexen Hülle.....	42
Abb. 18 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Solidity“	42
Abb. 19 Schematische Darstellung eines „CYTOOchips“	44
Abb. 20 Präparation des Fibronectin-beschichteten Glas-Chips („CYTOOchip“)	45
Abb. 21 Komponenten der Zellkammer (Cytoo)	46
Abb. 22 NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer: Mikrovolumen-Proben-Retentions-System	49
Abb. 23 Balkendiagramm: Vergleich der extrahierten mRNA-Konzentration verschiedener Versuchsansätze zur Protokolletablierung.....	53
Abb. 24 Schematische Darstellung der PCR	57
Abb. 25 Programmeinstellung „Advanced Relative Quantification“ zur Auswertung der gemessenen qRT-PCR-Daten	62
Abb. 26 Exemplarisches Auswertung erhobener qRT-PCR-Expressionsdaten mittels des Light Cycler 480.....	63
Abb. 27 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen	66
Abb. 28 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Aspect Ratio“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenkknorpel	67
Abb. 29 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Roundness“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenkknorpel	69
Abb. 30 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Circularity“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenkknorpel	70

Abb. 31	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Solidity“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenksknorpel.....	71
Abb. 32	Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „Strings“-Chondrozyten zu diffus organisierte Chondrozyten.....	74
Abb. 33	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Aspect Ratio von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze.....	76
Abb. 34	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Roundness von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze.....	77
Abb. 35	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Circularity von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze...	78
Abb. 36	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Solidity von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze...	79
Abb. 37	Verschiedene Zellgeometrien von humanen Kniegelenks-Chondrozyten	84
Abb. 38	Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Aspect Ratio zwischen verschiedenen Zellmorphologien	85
Abb. 39	Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Roundness zwischen verschiedenen Zellmorphologien	86
Abb. 40	Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Circularity zwischen verschiedenen Zellmorphologien	87
Abb. 41	Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Solidity zwischen verschiedenen Zellmorphologien	88
Abb. 42	Geometrisch-kontrollierte Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen .	90
Abb. 43	Übersichtsaufnahmen von superfiziellen, isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen	91
Abb. 44	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Aspect Ratio von superfiziellen Chondrozyten.....	92
Abb. 45	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Roundness von superfiziellen Chondrozyten.....	94
Abb. 46	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Circularity von superfiziellen Chondrozyten	96
Abb. 47	Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Solidity von superfiziellen Chondrozyten mit elliptischer Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) und rundlicher Zellgeometrie.....	97
Abb. 48	Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „O-Shape“ zu „H-Shape“ Chondrozyten.....	98
Abb. 49	Boxplot-Diagramm: Relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression isolierter, superfizieller Chondrozyten verschiedener räumlicher Organisationsformen	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 50	Boxplot-Diagramm: Relative Kollagen-mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1, 3A1 und 6A1 isolierter, superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen	105
Abb. 51	Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen isolierter superfizieller Chondrozyten	107
Abb. 52	Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den räumlichen Organisationsformen „Strings“ (A) und „Doublestrings“ (B).....	110
Abb. 53	Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“	111
Abb. 54	Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Big Clusters“ ..	112
Abb. 55	Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform	113
Abb. 56	Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen isolierter superfizieller Chondrozyten	115
Abb. 57	Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) isolierter, superfizieller Chondrozyten mit der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und „O-Shape“	116
Abb. 58	Boxplot-Diagramm: Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) zwischen isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ vs. „O-Shape“	118
Abb. 59	Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der relativen Kollagen mRNA-Expression bei Shape-Korrektur von „O-Shape“ zu „H-Shape“	119
Abb. 60	Balkendiagramm: Durchschnittliche, relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“	120
Abb. 61	Balkendiagramm: Durchschnittliche, relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“	121
Abb. 62	Balkendiagramme: Gemeinsame Darstellung der zellgeometrischen Charakteristika und der Genexpressionsprofile superfizieller Chondrozyten in Abhängigkeit ihrer räumlichen Organisationsform ...	123
Abb. 63	Balkendiagramme: Gemeinsame Darstellung der zellgeometrischen Charakteristika und der Genexpressionsprofile superfizieller isolierter Chondrozyten mit geometrisch-kontrollierter Zellform	125

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien	24
Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Gerätschaften	27
Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Softwares.....	28
Tabelle 5 Beispielhafte Auszählung vitaler Chondrozyten in einer Neubauer-Zählkammer	37
Tabelle 6 Protokoll mRNA-Extraktion	48
Tabelle 7 Protokoll Messung der mRNA-Konzentration.....	50
Tabelle 8 Protokoll für die Vakuumkonzentrierung der extrahierten mRNA	52
Tabelle 9 Protokoll für die Umschreibung von mRNA in cDNA.....	56
Tabelle 10 Verwendete Primersequenzen für die qRT-PCR.....	59
Tabelle 11 Ermittelte Primereffizienzen	60
Tabelle 12 Light Cycler 480-qRT-PCR-Programm.	61
Tabelle 13 Statistischer Vergleich von Chondrozyten verschiedener superfiziell räumlicher Organisationsformen.....	72
Tabelle 14 Korrelation der Ausprägung der Shape Deskriptoren (AR, Round, Circ, Sol) mit den aufsteigenden superfiziell räumlichen Organisationsformen	73
Tabelle 15 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren von Chondrozyten in der „Strings“-Formation zu diffus organisierten-Chondrozyten.....	74
Tabelle 16 Statistischer Vergleich von Chondrozyten verschiedener superfiziell räumlicher Organisationsformen.....	80
Tabelle 17 Prozentuale Änderung der Zellgeometrie in Bezug auf die Shape Deskriptoren zwischen isolierten superfiziellen Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze und superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel	82
Tabelle 18 Prozentuale Änderung verschiedener Shape Deskriptoren zwischen verschiedenen Zellmorphologien	88
Tabelle 19 Differenz der prozentualen Änderungen zwischen der in vivo Kombination „„Strings““ vs. „Diffus““ und den in vitro Möglichkeiten	89
Tabelle 20 Prozentualer Unterschied der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity innerhalb verschiedener Zellformen elliptisch/rundlich).....	99
Tabelle 21 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren zwischen den elliptischen und rundlichen Zellgeometrien von superfiziellen Chondrozyten	99
Tabelle 22 Statistischer Vergleich von superfiziellen Chondrozyten der Zellgeometrien elliptisch („Strings“, „H-Shape“) und rundlich („Diffus“, „O-Shape“)	100
Tabelle 23 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren zwischen den elliptischen und rundlichen Zellgeometrien von superfiziellen Chondrozyten.....	101
Tabelle 24 Statistischer Vergleich der relativen Kollagen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 25 Spearman-Rank-Order-Korrelation der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1 und 6A1) isolierter, superfizieller Chondrozyten	108
Tabelle 26 Statistischer Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und „Diffus“	114
Tabelle 27 Statistischer Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“, bzw. „O-Shape“	117
Tabelle 28 Prozentuale Änderung der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1)	119
Tabelle 29 Korrelation der Ausprägung zellgeometrischer Charakteristika (Aspect Ratio, Roundness), bzw. der relativen Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression mit den superfiziellen räumlichen Organisationsformen in aufsteigender Reihenfolge.....	124
Tabelle 30 Extrahierte mRNA-Proben zur Validierung einer Methode für die Verarbeitung der Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen.....	155
Tabelle 31 Übersicht der analysierten Chondrozyten pro räumliche Organisationsform	155
Tabelle 32 Übersicht über die Mittelwerte der Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Solidity, Circularity) in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen	156
Tabelle 33 Ausprägung de Shape Deskriptor in Abhängigkeit der Zellmorphologie superfizieller Chondrozyten in vivo und auf microengineerten Microadhäsionsflächen.....	156
Tabelle 34 Ausprägung verschiedener Shape Deskriptoren von Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus diffus organisierter Anordnung, Isol. aus Gemisch) bzw. aus definierten räumlichen Organisationsformen	157
Tabelle 35 Ausprägung verschiedener Shape Deskriptoren superfizieller Chondrozyten in einer elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie.	157
Tabelle 36 Paarweise Korrelation der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) verschiedener räumlicher Organisationsformen.....	158
Tabelle 37 Ausprägung der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen in Bezug auf die microengineerte Zellgeometrie „H-Shape“ und „O-Shape“	159

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACT	Autologes Chondrozyten-Transplantat bzw. Transplantation
AKDAE	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
AR	Aspect Ratio
Art.	Articulatio; dt.: Gelenk
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BG	Berufsgenossenschaft
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	Charge-coupled device; dt.: Ladungsgekoppeltes Bauteil
cDNA	complementary DNA; dt.: komplementäre DNS
Circ	Circularity
Col1A2	Kollagentyp 1A2
Col2A1	Kollagentyp 2A1
Col3A1	Kollagentyp 3A1
Col6A1	Kollagentyp 6A1
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbescos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid, dt.: DNS = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dt.	Deutschland
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
f	forward; dt.: vorwärts
Fa.	Firma
FACIT	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices; dt.: Fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices
FCS	Fetale calw serum, dt.: Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GL	Grenzlinie
HCl	Chlorwasserstoff
ICRS	International Cartilage Repair Society
Isol.	Isoliert
K	Korrelationskoeffizient
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
λ	Lambda, Wellenlänge
lat.	Lateinisch
Lig.	Ligamentum; dt.: Band
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
max.	Maximal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter

mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus, recombinant
mRNA	messenger Ribonucleinacid; dt.: Boten-Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymal stem cell, dt.: Mesenchymale Stammzelle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health; dt.: Nationale Gesundheitsinstitute
nm	Nanometer
No.	Number, dt.: Nummer
n. sign.	nicht signifikant
OA	Osteoarthrose
OCT	Osteochondrale Chondrozytentransplantation
OP	Operation
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate Buffered Saline; dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polychain Reaction, dt.: Polymerase Kettenreaktion
PG	Proteoglykan
PI	Propidiumiodid
PZM	Perizelluläre Matrix
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction; dt.: quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
r	backward; dt.: rückwärts
RLT-Puffer	RNeasy Lysis Tissue Buffer
RNA	Ribonucleinacid, dt.: RNS - Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Round	Roundness
RPL13A	Ribosomal Protein L13a

Abkürzungsverzeichnis

rpm	revolutions per minute; dt.: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Real Time
s.	Siehe
sek	Sekunden
sK	subchondraler Knochen
Sol	Solidity
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TEP	Totalendoprothese
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
vs.	versus
WHO	World Health Organisation; dt.: Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Anatomie des menschlichen Kniegelenks

Das menschliche Kniegelenk (lat. *Articulatio genus*) wird von drei artikulierenden Knochen, dem distalen Femur (Oberschenkelknochen), der proximalen Tibia (Schienbein) und der rückseitigen Patella (Kniescheibe), gebildet. Es untergliedert sich in zwei Teilgelenke: In das Femorotibialgelenk (lat. *Art. femorotibialis*) und in das Femoropatellargelenk (lat. *Art. femoropatellaris*). Das Femorotibialgelenk bildet die Hauptgelenkfläche und setzt sich aus den medialen und lateralen Gelenkskondylen des distalen Femurkopfplateaus sowie dem proximalen Tibiakopfplateau zusammen. Das Femoropatellargelenk besteht aus dem Gleitlager des distalen Femurkopfes, die sogenannte *Facies patellaris femoris*, und der rückseitigen Patellarfläche. Alle Gelenkflächen sind von einer hyalinen Knorpelschicht überzogen. Die Teilgelenke werden von einer gemeinsamen, stabilisierenden Gelenkkapsel umschlossen, welche sich aus der *Membrana fibrosa*, einer stabilisierenden Faserschicht, und der *Membrana synovialis*, welche die Synovialflüssigkeit produziert, zusammensetzt. Die Synovialflüssigkeit besteht aus einem Ultrafiltrat des Blutserums, dem die Produkte der Synovialzellen beigemischt sind. Sie füllt den Gelenkraum vollständig aus und erfüllt mehrere Aufgaben: Zum einen versorgt sie die Chondrozyten durch Diffusion mit Nährstoffen, zum anderen fungiert sie durch ihre visköse Beschaffenheit als Gleitmittel und reduziert die bei Gelenkbewegung auftretende Reibung (Schünke et al., 2005). Diese wird bei axialer Belastung ebenfalls durch die faserknorpeligen Innen- und Außenmenisken abgefangen, indem die Menisken die Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia vergrößern und gleichzeitig die Inkongruenz der Kondylen, also die suboptimale Passform der Gelenkflächen zueinander, ausgleichen (Wagner and Schabus, 2013). Weitere stabilisierende Wirkung erhält das Kniegelenk durch einen gut ausgeprägten extraartikulären Bandapparat, welcher sich u. a. aus zwei Seitenbändern, dem medialen Innenband (lat. *Ligamentum collaterale tibiale*) und dem lateralen Außenband (lat. *Lig. collaterale fibulare*), und zwei Kreuzbändern, dem vorderen und dem hinteren Kreuzband (lat. *Lig. cruciata anterior et posterior*), zusammensetzt. Die Seitenbänder verhindern das seitliche Aufklappen des Kniegelenks, während

Einleitung

die Kreuzbänder v. a. bei gebeugtem Kniegelenk eine Verschiebung von Femur und Tibia in sagittaler Ebene verhindern. Zusätzlich wird das Kniegelenk durch den Muskelapparat der unteren Extremitäten stabilisiert (Schünke et al., 2005).

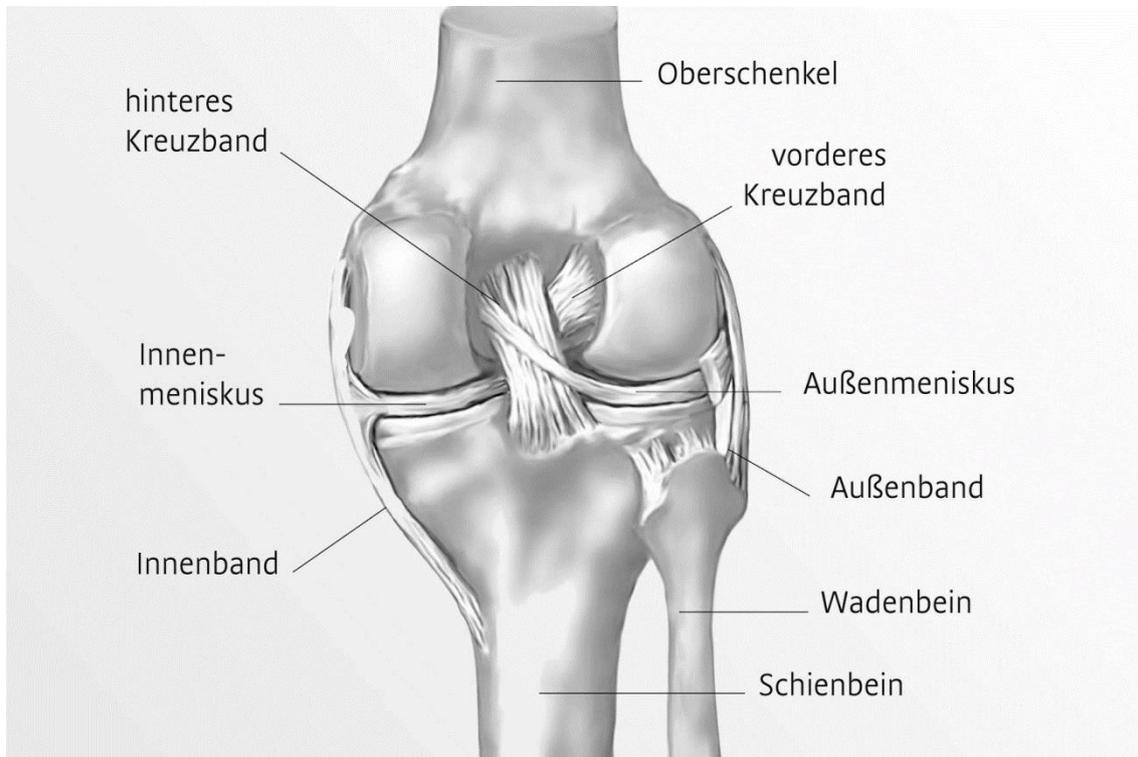


Abb. 1 Anatomie des humanen rechten Kniegelenks mit Bändersystem und Menisken Schematische Darstellung. Ansicht von dorsal. (<http://www.netklinik.de/orthopaedie/knie.htm>; Abruf: 10.10.2016)

Die funktionelle Beweglichkeit des Kniegelenks findet v. a. im Femorotibialgelenk statt. Es wird vereinfacht als Drehscharniergelenk oder auch als bikondyläres Gelenk bezeichnet. Es ermöglicht eine Kombination aus Roll- und Gleitbewegung der beteiligten Gelenkkörper. Dadurch sind insgesamt vier Bewegungen möglich: die Beuge- und Streckbewegung um die Transversalachse (Flexion und Extension), sowie die Innen- und Außenrotation um die Longitudinalachse (Paulsen, 2000).

Die oben beschriebenen Charakteristika des Kniegelenks können als Erklärungsansatz für die Anfälligkeit des Knies für Gelenksverletzungen und degene-

rative Erkrankungen herangezogen werden. So verbindet das Kniegelenk die zwei längsten Hebelarme (Ober- und Unterschenkel) des menschlichen Skeletts. Außerdem ist das Kniegelenk auf Grund seiner exponierten Position mit relativ wenig schützendem Fett-, Binde- und Muskelgewebe umgeben (Aumüller et al., 2014). Des Weiteren lastet, je nach Bewegungsablauf, das bis zu dreifache Körpergewicht auf Teilen des Kniegelenks, was die Degenerations- und Verletzungsgefahr zusätzlich begünstigt (Paul, 1976).

1.2 Hyaliner Gelenkknorpel

Gelenkknorpel besitzt eine ungewöhnliche Kombination an Eigenschaften, die ihn einzigartig macht und von den anderen Geweben unterscheidet: er ist zwar nicht so starr wie Knochen, stellt jedoch das steifste Weichgewebe des Körpers dar. So verformt sich hyaliner Gelenkknorpel bei Einwirkung von größerem mechanischem Stress, nimmt aber anschließend seine ursprüngliche Form wieder an. Durch diese reversible Deformität besitzt der Knorpel die einzigartige Fähigkeit, mit größeren Belastungen auf das bewegte Gelenk umzugehen (Hamerman and Schubert, 1962). Gesunder Gelenkknorpel absorbiert Druckbelastung mit einem überraschend niedrigen Reibungskoeffizienten (Mollenhauer and Aurich, 2003, Behrens et al., 2004), da er eine glatte, nahezu reibungsfreie Oberfläche besitzt und hierdurch im Zusammenspiel mit der Synovialflüssigkeit für ein reibungsarmes und somit schmerzfreies gegeneinander gleiten der artikulierenden Knochen sorgt (Kuettner et al., 1991).

Der Gelenkknorpel ist ein spezialisiertes Gewebe ohne Blutgefäße (avaskulär), ohne Innervation (aneural) und ohne Lymphgefäße (alymphatisch) (Hamerman and Schubert, 1962, Goldring and Marcu, 2009), welches sich v. a. aus extrazellulärer Matrix (EZM) und zu einem geringeren Anteil aus Chondrozyten als alleinig vorkommende Zellart zusammensetzt (Stockwell, 1971). Die EZM besteht zu 70 - 80 % aus gebundenem Wasser. Weitere wichtige Bestandteile sind Proteoglykane (PG), v. a. Glykosaminoglykane (GAG), Kollagene, v. a. der feinfibrilläre Kollagentyp II, sowie nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine (Buckwalter and Mankin, 1997). Seine hohe biomechanische Widerstandsfähig-

Einleitung

keit und Zugfestigkeit verdankt der Knorpel der Zusammenarbeit dieser Komponenten (Behrens et al., 2004).

Obwohl Chondrozyten max. fünf Prozent des Knorpelgesamtvolumens ausmachen (Hamerman and Schubert, 1962, Mollenhauer and Aurich, 2003) und adulte Chondrozyten nur bedingt teilungsfähig sind, sind sie essentiell für die Produktion, Organisation und Aufrechterhaltung der EZM (Goldring and Marcu, 2009). Sie liegen entweder einzeln oder in kleinen Gruppen zusammen und sind jeweils von einer perizellulären Matrix (PZM) und - Kapsel umgeben. Diese sowohl funktionelle als auch metabolische Einheit aus Chondrozyt und umgebenden Knorpelhof (Territorium) wird als Chondron bezeichnet (Poole et al., 1992, Benninghoff, 1925, Horikawa et al., 2004). Die Gruppierung mehrerer Chondrozyten in einem Chondron findet sich v. a. im adulten Knorpelgewebe, während im embryonalen und im jungen Alter die Chondrozyten gleichmäßig verteilt sind (Hamerman and Schubert, 1962). Adulte Chondrozyten können auf verschiedene Stimuli reagieren. Hierzu zählen z. B. extrinsische Faktoren wie mechanische Stimuli (Millward-Sadler and Salter, 2004) durch Verletzungen (Fitzgerald et al., 2004) oder durch Instabilität des Kniegelenks (Goldring and Goldring, 2007). Weiterhin spielen biologische Stimuli wie Zytokine und Wachstumsfaktoren (Goldring and Goldring, 2007), Änderungen in Strömungspotentialen, Zelldeformitäten (Guilak et al., 1995) oder Veränderungen der osmotischen Bedingungen und des pH-Werts (Gray et al., 1988) eine Rolle. Die Nährstoffversorgung der Chondrozyten erfolgt auf Grund der spezifischen Gewebeigenschaften nur durch Diffusion.

Der hyaline Knorpel lässt sich mit zunehmender Gewebetiefe, von der Gelenkoberfläche bis zum subchondralen Knochen in vier horizontale histologische Zonen einteilen (I-IV): Die superfizielle oder oberflächliche Zone (I), welche der Gelenkoberfläche entspricht, die transitionelle Zone oder Übergangszone (II), die Radiärzone (III) und die kalzifizierte Zone (IV) (Benninghoff, 1925, Clark, 1990) (s. Abb. 2).

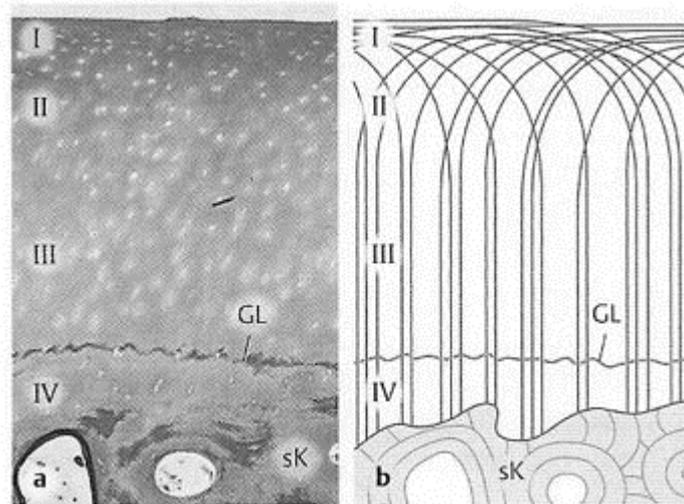


Abb. 2 *Histologische und schematische Darstellung des hyalinen Gelenkknorpels. a: Gelenkknorpel (menschlicher Calcaneus) im vertikalen Schnitt (Goldner-Färbung, 30-fache Vergrößerung); b: Schematische Darstellung des histologischen Schnittes mit arkadenförmigen Kollagenfaserverlauf. Zoneneinteilung: Superfizielle Zone (I), Übergangszone (II), Radiärzone (III), kalzifizierte Zone (IV); sK= subchondraler Knochen; GL= Grenzlinie („Tidemark“) zwischen III und IV (Lüllmann-Rauch, 2012).*

Die histologische Einteilung basiert auf Unterschieden in der Morphologie (Kuettner et al., 1991, Jadin et al., 2005, Aydelotte and Kuettner, 1988), der Zellanordnung, der biomechanischen und biochemischen Zelleigenschaften (Chen et al., 2001, Krishnan et al., 2003, Schinagl et al., 1997, Klein et al., 2007), der Kollagenfaserarchitektur (Nieminen et al., 2001), sowie in der Matrixzusammensetzung (GAG-Konzentration und Wassergehalt) (Venn and Maroudas, 1977, Maroudas and Venn, 1977, Burr, 2004).

Durch alle vier Zonen ziehen Kollagenfasern, an denen sich die Chondrozyten in ihrer Ausrichtung orientieren (s. Abb. 3). Die Kollagenfasern sind fest in der kalzifizierten Zone verankert und verlaufen von dort senkrecht durch den verkalkten Streifen, auch Tidemark genannt, sowie durch die radiäre Zone. Anschließend nehmen die Kollagenfasern in der Übergangszone einen arkadenförmigen Verlauf ein, um dann in der oberflächlichen Zone parallel zur Gelenkoberfläche vorzuliegen, bevor sie erneut arkadenförmig durch die Übergangszone und anschließend wieder senkrecht in die tieferen Zonen absteigen. Ein Übergang der Fibrillen zum Knochen findet nicht statt, der Knorpel ist jedoch

Einleitung

durch feine verkalkte Fortsätze unverschieblich am Knochen befestigt (Benninghoff, 1925).

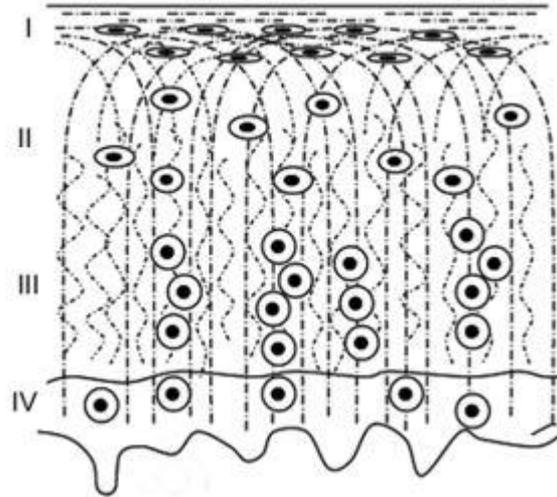


Abb. 3 *Zonale Ausrichtung der Chondrozyten entlang der Kollagen-Arkaden.* Schematische Darstellung der Chondrozytenausrichtung entlang der Kollagenfasern: Superfizielle Zone mit horizontaler Ausrichtung der Knorpelzellen (I); Transitionelle Zone mit eher zufälliger Zellorientierung (II); Tiefere Zonen (Radiäre Zone (III) und Kalzifizierungszone (IV)) mit vertikaler Orientierung der Chondrozyten (verändert nach (Mansfield et al., 2008)).

Die Zelldichte nimmt im hyalinen Knorpel sowohl mit zunehmendem Abstand von der Gelenkfläche, als auch mit zunehmendem Alter progressiv ab (Stockwell, 1967). Dahingegen nimmt das Zellvolumen und das Verhältnis von Proteoglykanen relativ zum Kollagengehalt mit zunehmender Knorpeltiefe zu (Goldring and Marcu, 2009). Die Zelldichte innerhalb des Gewebes hängt vermutlich von vielen Faktoren, die über die Gelenkoberfläche einwirken, wie z. B. Nährstoffe oder mechanischer Stress, ab (Stockwell, 1971).

Der hyaline Knorpel ist in seinem Aufbau so konzipiert, dass er physiologischen Belastungen und den dadurch entstehenden biomechanischen Kräften standhalten kann. Nur durch gezieltes Zusammenwirken von Chondrozyten, EZM und der spezifischen Anordnung der Kollagenfasern kann das hydrodynamische Dämpfungssystem des Knorpelgewebes effizient arbeiten und die bei Bewegung auftretenden Kräfte absorbieren, umverteilen und an den subchondralen Knochen weiterleiten (Rolaufts et al., 2009, Chen et al., 2001, Klein et al., 2007, Schinagl et al., 1997). Die Kompressionsfähigkeit des Dämpfungssys-

tems beruht u.a. auf der enormen Wasserbindung durch hochmolekulare Proteoglykane und deren Einschluss in ein Kollagengerüst aus Kollagentyp II - Fasern (Behrens et al., 2004). In folgender Abbildung wird der so genannte Hyaluron-Aggrekan-Komplex und dessen Komponenten detaillierter dargestellt (s. Abb. 4):

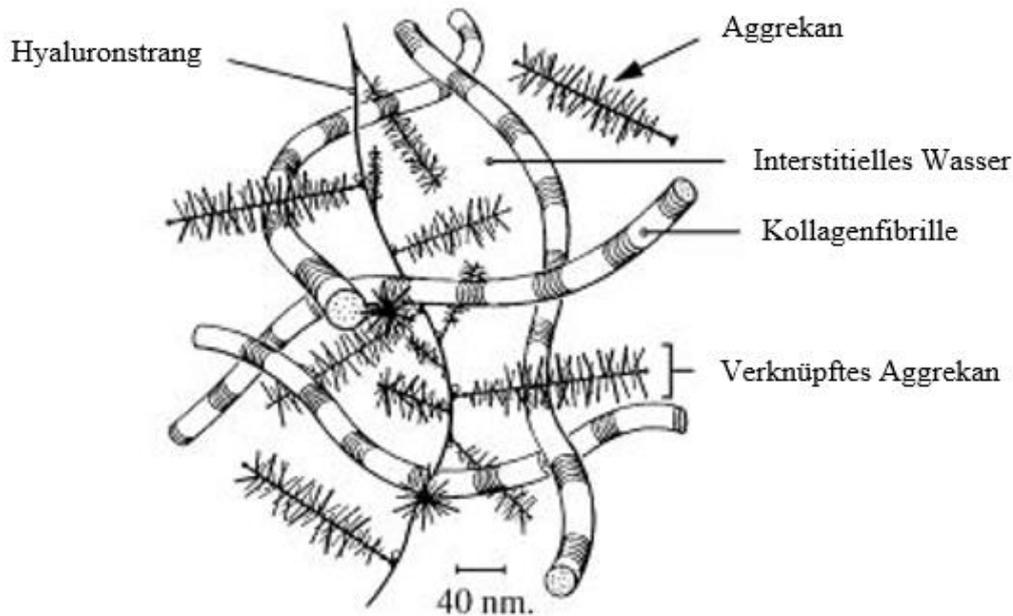


Abb. 4 Aufbau der extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich v. a. aus gebundenem Wasser, Proteoglykanen und Kollagenen zusammen. Hierbei bilden die Proteoglykane und Kollagenfasern den sogenannten Hyaluron-Aggrekan-Komplex: Die negativ geladenen Proteoglykane im Knorpel, v. a. Aggrekan, sind über ihre zentrale Polypeptidkette an einen Hyaluronsäurestrang geknüpft und bilden große, zusammenhängende Aggregate. Sie sind in einem dichten Netzwerk aus Kollagenfasern eingeschlossen und binden auf Grund ihrer negativen Polarität interstitielles Wasser. Hierdurch steigt der extrazelluläre Druck an, der dem Knorpelgewebe eine physiologische Vorspannung verleiht (verändert nach (Lu and Mow, 2008)).

Hyaliner Gelenknorpel besitzt ein sehr eingeschränktes Heilungsvermögen, welches eine eindeutige Altersabhängigkeit aufweist (Mollenhauer and Aurich, 2003). Neben der Anfälligkeit des Kollagen-Aggregat-Netzwerks (Bonassar et al., 1995) spielen auch die Anatomie und die Nährstoffversorgung durch Diffusion eine nicht-begünstigende Rolle (Buckwalter and Mankin, 1997). Bei Knorpelschäden ohne Verletzung des subchondralen Knochen findet in den meisten Fällen keine Defektregeneration statt. Ist die subchondrale Knochenlamelle dagegen ebenfalls betroffen, kann ein Ersatzfasergewebe entstehen, das meist jedoch nach ein paar Jahren aufgrund unzureichender mechanischer Eigenschaften wieder degeneriert (Buckwalter, 2002).

1.3 Gelenkfläche: Die superfizielle Zone

In Bezug auf die Funktion und Regeneration des hyalinen Knorpels ist v. a. die Rolle der superfiziellen Zone hervorzuheben. Sie ist als oberflächliche Schicht den größten mechanischen Kräften ausgesetzt und daher anfällig für Verletzungen und degenerative Erkrankungen. Mit einer Schichtdicke von 200 - 300 µm ist sie die dünnste der vier Knorpelzonen, hat direkten Kontakt zur gegenüberliegenden Knorpelfläche und zeigt auf biomechanische Stimuli besondere proliferative und biosynthetische Reaktionen (Lee et al., 1998, Guilak et al., 1995). Die superfizielle Zone unterscheidet sich sowohl in der Zusammensetzung der EZM (Bayliss et al., 1983) als auch in der Morphologie der Chondrozyten (Palfrey and Davies, 1966) und ihrem Metabolismus (Eger et al., 2002) von den tieferen Knorpelschichten (Lee et al., 1998). So weist sie innerhalb der vier Zonen das dichteste Kollagenfasernetz (Bayliss et al., 1983) sowie den höchsten Kollagengehalt und einen sehr hohen Wasser- und Fibronectinanteil auf (Temenoff and Mikos, 2000). Die dicht gepackten, ineinandergreifenden Kollagenfasern liegen parallel zur Oberfläche angeordnet und verteilen hierdurch die einwirkenden Zugkräfte auf die gesamte Knorpeloberfläche (Broom and Marra, 1985, Glaser and Putz, 2002).

Die Chondrozyten der superfiziellen Zone unterscheiden sich von Chondrozyten der tieferen Zonen bzgl. ihres Zytoskeletts (Kim and Spector, 2000), ihrer bio-

mechanischen Eigenschaften (Jurvelin et al., 1996), der Genexpression (Jay et al., 2001) und ihrer räumlichen Anordnung (Rolauffs et al., 2009). Die zelluläre Dichte ist hier im Vergleich zu den tieferen Zonen am höchsten (Stockwell, 1967, Egli et al., 1988). Die Knorpelzellen der superfiziellen Zone sind flach, leicht ellipsoid und liegen oberflächenparallel vor (Quinn et al., 2005).

In der „konventionellen“ Knorpelhistologie werden Gewebe in vertikalen Schnitten betrachtet. Hierbei werden die superfiziellen Chondrozyten klassischerweise als Einzelzellen beschrieben (Hunziker et al., 2002) und man geht von einer gewissen zufälligen Verteilung aus (Brighton et al., 1984, Aicher and Rolauffs, 2014). Ändert man jedoch den Blickwinkel und betrachtet die Knorpeloberfläche aus der Vogelperspektive, also horizontal, ordnen sich die Chondrozyten „plötzlich“ in horizontal-orientierten, planaren Zellgruppen an (Schumacher et al., 2002, Aicher and Rolauffs, 2014). Dabei sind die Chondrozyten der superfiziellen Zone räumlich anders organisiert als Chondrozyten der tieferen Schichten (Rolauffs et al., 2008): während Chondrozyten der tieferen EZM und v. a. in der radiären Zone in vertikalen Säulen ausgerichtet sind (Kuettner et al., 1991, Aydelotte and Kuettner, 1988, Poole, 1997, Brighton et al., 1984), bilden Chondrozyten der superfiziellen Zone spezifische, horizontal-orientierte Zellmuster. Hierbei werden vier physiologische Zellmuster unterschieden: Paare aus zwei Zellen, „Strings“ aus drei oder mehr Chondrozyten in einer Reihe, Cluster aus drei oder mehr Chondrozyten sowie Einzelzellen, die scheinbar keine direkten Nachbarschaftsbeziehungen zu anderen Zellen aufweisen (Aicher and Rolauffs, 2014, Rolauffs et al., 2008) (s. Abb. 5).

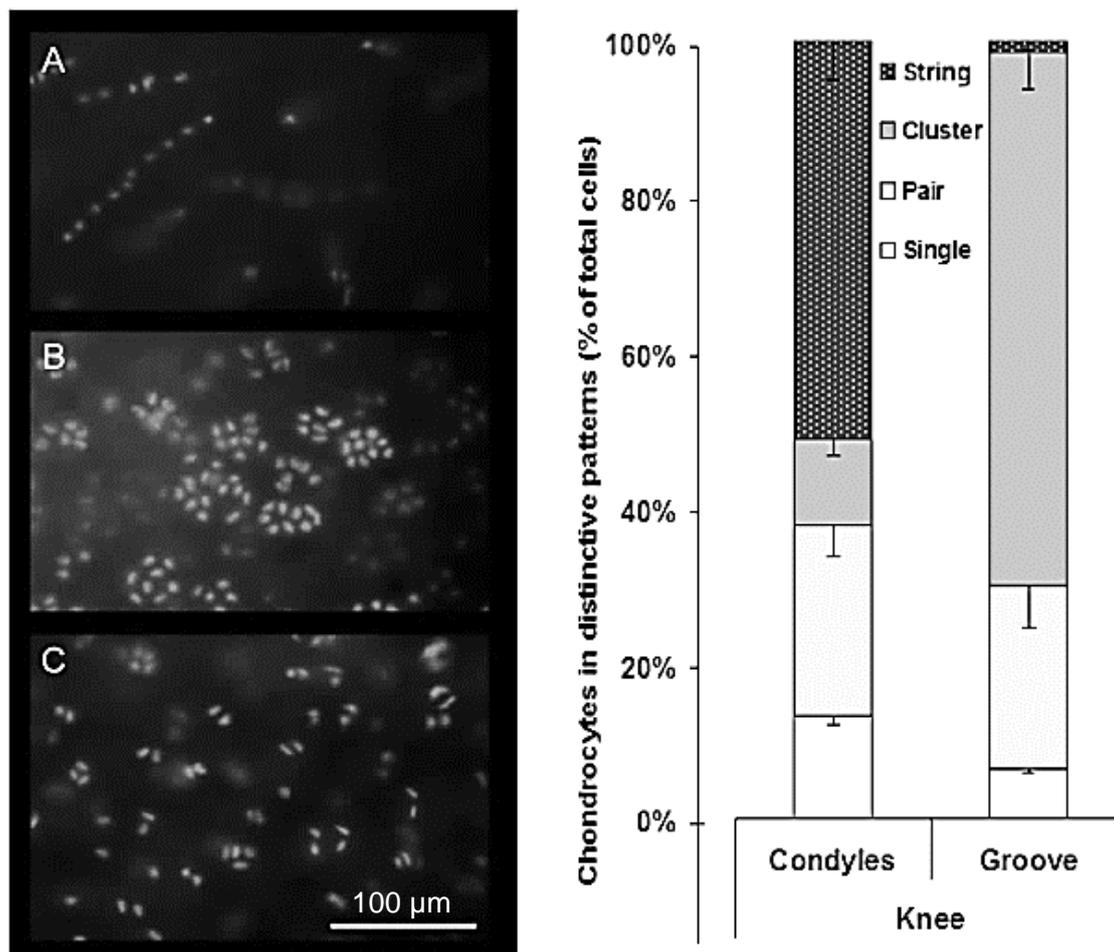


Abb. 5 Verschiedene Zellmuster der superfiziellen Zone im humanen Kniegelenksknorpel. Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten in der Kondyle eines intakten humanen Kniegelenks. Propidiumiodidfärbung nach Membranpermeabilisation. A: „Strings“, B: Clusters, C: Paare. In jeder Aufnahme sind verstreut einzelne Chondrozyten zu sehen. Rechts: Vergleich der Zellmuster zwischen der Femurkondyle (Condyles) und Fossa intercondylaris (Groove). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Muster pro Kniegelenksbereich. Die Verteilung ist mit der unterschiedlichen Gelenkbiomechanik assoziiert. (Rolaufts et al., 2008)

Jede Gelenkfläche der großen Gelenke (z. B. Schulter-, Knie-, Sprunggelenk) wird von einem der vier Muster dominiert. Somit korreliert die Art des Organisationsmusters mit dem jeweiligen biomechanischen Gelenktyp. Die Zellorganisation der superfiziellen Zone ist demnach strukturell und funktionell auf die jeweiligen Belastungen der verschiedenen Gelenktypen angepasst (Rolaufts et al., 2008). So findet man in Gelenken mit nur einer Bewegungsfreiheit (z. B. das Sprunggelenk und der humeroulnare Teil des Ellbogengelenks) signifikant häu-

figer Zellpaare, während in biaxialen Gelenken (z. B. die Femurkondylen des Kniegelenks und das Kapitulum des distalen Humerus) mit zwei Rotationsachsen v. a. „Strings“ vorherrschen (Aicher and Rolauffs, 2014). Die Annahme, dass die Organisation der Chondrozyten und die Funktionalität des Knorpels direkt zusammenhängen, wird durch die Tatsache verstärkt, dass sich die prozentuale Zusammensetzung der vier Muster in einem Gelenk Arthroseggradabhängig verändert (Rolauffs et al., 2010).

Zusätzlich zu den vier physiologischen Zellmustern gibt es die sogenannten „Doublestrings“ als fünftes, „pathologisches“ Zellmuster (s. Abb. 6). Sie bestehen aus zwei nahezu parallel angeordneten „Strings“, unterscheiden sich aber deutlich von den Clustern. „Doublestrings“ stellen ein Arthrose-assoziiertes Muster dar, da sie in makroskopisch intakten Gelenkknorpel-Arealen gefunden werden, die sich in Nachbarschaft zu fokalen Arthrose-Läsionen befinden, jedoch nicht im gesunden Knorpel und auch nicht direkt in Osteoarthrose (OA) – Läsionen (Rolauffs et al., 2010). Auf die Veränderungen der superfiziellen Zone im Laufe einer OA wird im Kapitel 1.4.2 „Osteoarthrose auf zellulärer Ebene“ näher eingegangen.

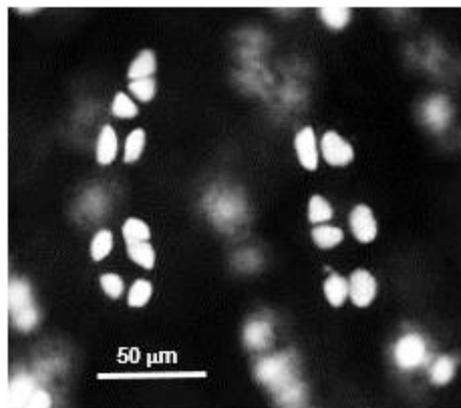


Abb. 6 „Doublestrings“ als Ausdruck degenerativer Veränderungen der superfiziellen Zone im humanen Kniegelenkknorpel Calcein-AM-Färbung, LSM 510 Fluoreszenz-Aufnahme, 10 x-Objektiv (eigenständig fotografierte Knorpeldisc).

1.4 Osteoarthrose

1.4.1 Osteoarthrose allgemein

Osteoarthrose (OA), im Sprachgebrauch auch nur „Arthrose“ genannt, ist eine bisher nicht vollständig verstandene, degenerative Erkrankung des gesamten Gelenks. Sie ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit (Engelhardt, 2003, Woolf and Pfleger, 2003) und verursacht in der älteren Bevölkerung mehr Einschränkungen und Behinderungen als jede andere Erkrankung (Woolf et al., 2012). OA geht mit einem progredienten Verlust des Knorpelgewebes einher. Dies kann bis zur Freilegung der Knochenoberfläche führen (Fuchs et al., 2013). Ebenso werden die umliegenden Strukturen wie Bänder, Knochen und Muskeln geschädigt (Madry et al., 2012). Das Kniegelenk ist am häufigsten von OA betroffen (Oliveria et al., 1995, Fuchs et al., 2013). Hier sind zusätzlich degenerative Veränderungen an den Menisken, der Gelenkkapsel und der Synovia zu beobachten (Madry et al., 2012, Martel-Pelletier et al., 2008, Aigner et al., 2006b, Wieland et al., 2005). OA wird je nach Ursache in die primäre oder sekundäre Form unterteilt. Zu den primären Arthrosen zählen Arthroseerkrankungen, denen keine eindeutige Ursache zugeordnet werden kann. Sekundäre Arthrosen sind dagegen eine Folge angeborener oder erworbener Erkrankungen bzw. Verletzungen (Robert-Koch-Institut, 2013). Fortgeschrittene, unbehandelte OA führt zu Schmerzen, Fehlbelastungen, Gelenksversteifungen sowie zum Verlust der Gelenkfunktion, was schlussendlich eine enorme Bewegungseinschränkung der betroffenen Person bedeutet (Woolf and Pfleger, 2003). OA-erkrankte Patienten beklagen häufig eine durch die Schmerzen bedingte, verminderte Leistung der Arbeitsfähigkeit im Beruf und zu Hause, was oft zur sozialen Isolation und teilweise zu Depressionen führt (Wieland et al., 2005, Kean et al., 2004). Frauen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit an OA zu erkranken (Oliveria et al., 1995). Schätzungsweise sind ab dem 60. Lebensjahr etwa die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer betroffen (Robert-Koch-Institut, 2013).

OA weist eine sehr geringe Mortalitätsrate auf. Weitaus bedeutender ist die sozioökonomische Relevanz sowie die individuelle Beeinträchtigung der Patienten

durch die Erkrankung (Engelhardt, 2003). Volkswirtschaftliche Bedeutung erlangt die OA u. a. durch die hohen direkten (ambulante und stationäre Aufenthalte, sowie Rehabilitationsmaßnahmen) und indirekten (Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und Frühberentung) Kosten. Allein im Jahr 2014 waren in Deutschland beinahe fünf Millionen Arbeitsunfähigkeitstage auf den Befund Kniegelenksarthrose (Gonarthrose) zurückzuführen (Beispiel 2014: 4 771 947 Arbeitsunfähigkeitstage; Bundesministerium für Gesundheit).

Risikofaktoren für die Entstehung einer OA sind u. a. genetische Prädisposition, körperlich belastende Berufstätigkeiten, zunehmendes Alter, sowie Fehlbelastungen durch Adipositas oder Achsabweichungen (z.B. das „O-Bein“, lat.: Genu varum). Weiterhin können Muskelschwäche, metabolische und endokrinologische Erkrankungen oder posttraumatische Gelenksverletzungen mit Schäden an Bändern bzw. Menisken oder andere Knorpeldefekte sekundär in eine Arthrose münden (Sarzi-Puttini et al., 2005, Sharma et al., 2001, Felson et al., 2000, Muthuri et al., 2011, Blagojevic et al., 2010, Niemeyer et al., 2013).

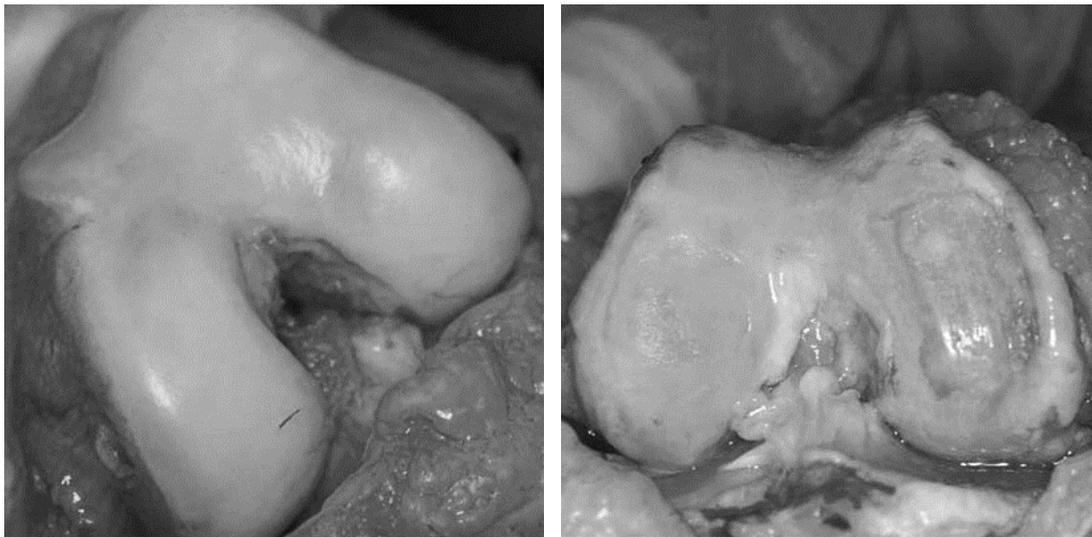


Abb. 7 Makroskopisch sichtbare Veränderung des humanen Kniegelenkknorpels im Verlauf der OA. Links: Intaktes Knorpelgewebe des distalen Femurs; Rechts: OA-bedingte Schädigung des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen (<http://www.sportropaedicum.de/fachbereiche/knie/arthrose.html>; Abruf: 16.10.2016).

Im Frühstadium der OA sind an der Gelenksknorpeloberfläche bereits makroskopische Veränderungen wie kleine Fissuren, Rauheiten und Erosionen der oberflächlichen Knorpelschicht erkennbar. Bei progredienter Erkrankung kommt es durch die starke Abnahme des Proteoglykangehalts und die hierdurch verstärkte Hydrierung des Gewebes zur Knorpelerweichung. Zusätzlich bilden sich in der EZM Risse und das Kollagenfasernetz wird zerstört, wodurch der Knorpel an Elastizität verliert (Dimmler et al., 2005, Mayne, 1989). Dies führt schlussendlich zum progressiven Verlust der gesamten Knorpelschicht. Da dieser Prozess auf den artikulierenden Gelenkflächen simultan stattfindet, reibt im Endstadium der OA der freiliegende subchondrale Knochen direkt auf dem gegenüberliegenden, ebenfalls freiliegenden Knochen (s. Abb. 7, rechtes Bild). Durch die neuroanatomische Besonderheit einer fehlenden Nervenversorgung des Knorpels bleiben Schädigungen im Frühstadium häufig asymptomatisch und klinisch unauffällig. Daher erfolgt die Erstdiagnose oft erst im fortgeschrittenen Stadium, wenn der Knorpelschaden bereits bis zum subchondralen Knochen reicht.

1.4.2 Osteoarthrose auf zellulärer Ebene

OA lässt sich in zwei Stadien einteilen. Hierbei erfolgt zuerst eine biosynthetische Phase, in der die Chondrozyten durch eine gesteigerte Produktionsrate versuchen, die geschädigte EZM zu reparieren. Trotz aller Bemühungen kommt es anschließend zu einer degradativen Phase, in welcher katabole Prozesse überwiegen und die Produktion von Enzymen zur Hemmung der Matrixsynthese, zum Verdau des Kollagenfasernetzes und somit zum Verlust hydrodynamisch wichtiger EZM-Komponenten führt (Sandell and Aigner, 2001). Die verantwortlichen Enzyme (z. B. Metalloproteasen (Borzi et al., 2000)), entzündungsassoziierte Mediatoren (z. B. Zytokine (Berenbaum, 2004) und Chemokine (Haringman et al., 2004)) werden primär von Chondrozyten produziert, die durch verschiedene Stimuli, wie z. B. mechanischer oder oxidativer Stress und Änderungen in der Matrix und den Wachstumsfaktoren während dem Altern angeregt werden (Goldring and Marcu, 2009, Wieland et al., 2005). Es besteht nach wie vor die Diskussion, ob der Krankheitsverlauf ursprünglich vom Knorpel

oder vom subchondralen Knochen oder von beiden Geweben ausgeht (Aicher and Rolaufts, 2014). Die gängige Meinung ist jedoch, dass bei einem Großteil der Patienten die OA auf Zellebene, v. a. an der Gelenksoberfläche, beginnt (Madry et al., 2012, Aicher and Rolaufts, 2014).

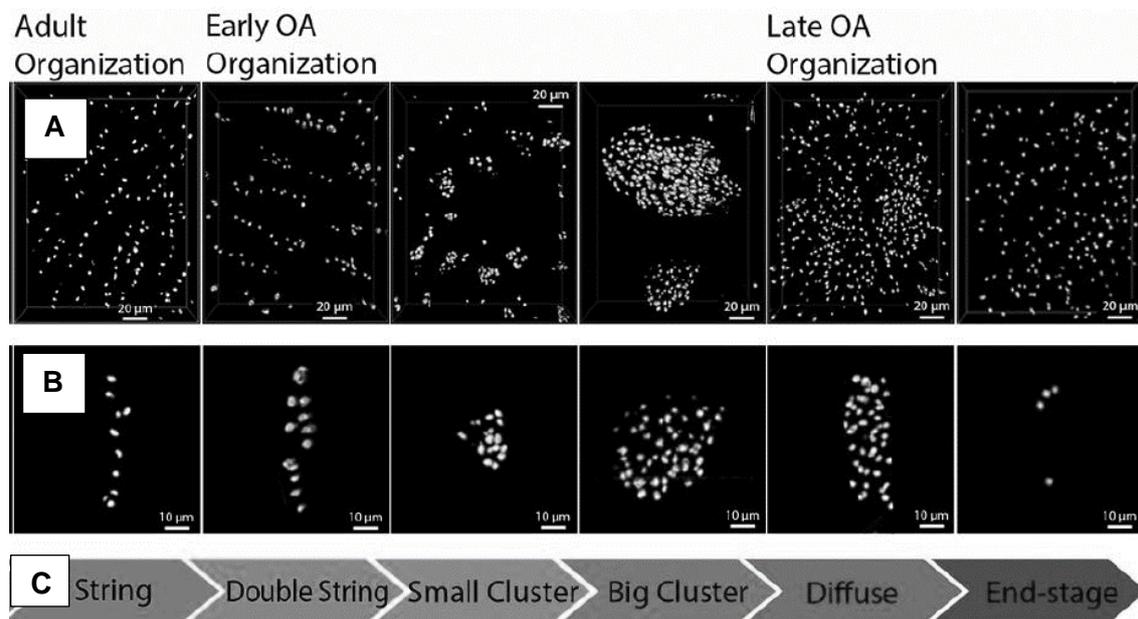


Abb. 8 Modell der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten im humanen Kniegelenk bei Progression der Osteoarthritis. In der Flowchart sind anhand von Übersichtsaufnahmen die verschiedenen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten unter OA-Progression im adulten humanen Kniegelenk dargestellt (A). In (B) sind exemplarische Organisationsformen in einer höheren Vergrößerung gezeigt, in (C) werden die Organisationsformen benannt. Die Kniegelenksfläche wird im gesunden adulten Knorpel von „Strings“ dominiert. Mit fortlaufender Progression beinhaltet der OA-betroffene Knorpel zunächst „Doublestrings“, dann „Small Clusters“ und anschließend „Big Clusters“. Im Endstadium herrscht keine räumlich organisierte Anordnung der superfiziellen Chondrozyten mehr vor, vielmehr dominiert eine diffuse, zufällige Verteilung der Chondrozyten bei geringer Zelldichte. Propidiumiodid-Färbung, Blick „von oben“ auf die Gelenkfläche (Felka et al., 2016), modifiziert.

Im Zuge der OA verändern sich sowohl in der fokalen Arthrose-Läsion als auch in dem umgebenden intakten Knorpelgewebe die Zellanzahl und die Zellorganisation. Eine vergleichende Analyse der Genexpression von Chondrozyten im Bereich der Läsion und im intakten Gewebe zeigt phänotypische Unterschiede in den Genen, die an der EZM-Synthese und der Zellproliferation beteiligt sind

Einleitung

(Sato et al., 2006, Fukui et al., 2008, Geyer et al., 2009, Mankin and Lippiello, 1970). Auch in Bezug auf die räumliche Organisation der Knorpelzellen lassen sich in der superfiziellen Zone starke Unterschiede zwischen den Chondrozyten innerhalb und außerhalb der Läsion, als auch unter Progression der OA feststellen (Rolauffs et al., 2010) (s. Abb. 8): so unterscheiden sich superfizielle Chondrozyten in nicht-degenerativem Knorpel von Chondrozyten, die sich in gesunden Bereichen eines Knorpels mit fokaler OA-Läsion befinden (Aicher and Rolauffs, 2014): Chondrozyten im vollständig gesunden hyalinen Knorpel der Femurkondyle sind überwiegend in „Strings“ angeordnet. Befindet sich das Kniegelenk in einem sehr frühen OA-Stadium, sind die Chondrozyten vermehrt in den sogenannten „Doublestrings“ (s. Kapitel 1.3) angeordnet, hierbei sieht die Knorpeloberfläche makroskopisch noch intakt aus. Außerdem sind „Doublestrings“ in Gelenksarealen mit intaktem Knorpelgewebe in der Nähe einer fokalen OA-Läsion auffindbar (Aicher and Rolauffs, 2014). Im fortgeschrittenen OA-Stadium sind zunächst „Small Clusters“, später Big Cluster-Formationen dominant. Im Endstadium der OA, repräsentativ im Bereich der OA-Läsionen, geht die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten vollständig verloren: Es dominieren keine räumlich-organisierten Muster, sondern die Chondrozyten liegen einzeln, als diffus verteilte Zellen vor (Felka et al., 2016). Zusätzlich verlieren die Chondrone ab der „Doublestrings“-Formation sukzessive ihre PZM, bis diese ab den Big Clustern so gut wie nicht mehr vorhanden ist. Hierdurch sind die Chondrozyten den Kompressionskräften, die auf die Gelenkfläche wirken, stärker ausgeliefert, was wiederum einen schnelleren Zelluntergang bedingt (Felka et al., 2016).

1.5 Kollagene

1.5.1 Kollagene allgemein

Kollagene stellen die größte Protein-Familie des menschlichen Körpers dar (Lüllmann-Rauch, 2012). Allen Kollagenen ist als Grundbaustein die Tripelhelix gemein. Diese setzt sich aus drei linkshelikalen Peptidketten (α -Ketten) zusammen, welche sich zu einer rechtsgängigen Superhelix (Tripelhelix) zusammenlagern (Lüllmann-Rauch, 2012). Bei den Tripelhelices sind sowohl homotrimere (also drei identische α -Ketten), als auch heterotrimere (zwei oder drei verschiedene α -Ketten) Kombinationen möglich. Zu den homotrimeren Kollagenen zählen u. a. die Kollagentypen II, III, VII, VIII und X, zu den heterotrimeren Kombinationen die Kollagentypen I, IV, V, VI, IX und XI. Jede α -Kette besitzt einen eigenen Genlocus, der nach Kollagentyp und α -Kette benannt wird. So besteht z. B. der heterotrimere Kollagentyp I aus zwei verschiedenen α -Ketten ($[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$), deren Genloci mit COL1A1 und COL1A2 bezeichnet werden (Gelse et al., 2003). Weiterhin werden die Kollagene in funktionell unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Hierbei bilden die fibrillären Kollagene die größte Gruppe (90 %) (Gelse et al., 2003). Zu den fibrillären Kollagenen zählen u. a. die am häufigsten vorkommenden Kollagentypen I, II und III, sowie die selteneren Kollagentypen V und XI (Gelse et al., 2003). Die fibrillären, stabförmigen Kollagenmoleküle lagern sich im Extrazellulärraum parallel aneinander und werden durch kovalente Bindungen quervernetzt, woraus sich die Zugfestigkeit der Kollagenfibrillen ergibt.

Als weitere wichtige funktionelle Gruppe sind die nicht-fibrillären Kollagene zu erwähnen, auch fibrillen-assoziierte Kollagene (FACIT) genannt, zu denen u. a. die Kollagentypen IX, XII und XX zählen (Gelse et al., 2003, Van der Rest and Garrone, 1991). Als besonderes Baumerkmal zeichnen sich die FACITs durch nicht-helikale Zwischenstücke aus, die die helikale Molekülstruktur auf Teilstücken unterbrechen (Lüllmann-Rauch, 2012). Die Gruppe der FACIT-Kollagene bilden selber keine Fibrillen aus, spielen aber trotzdem eine relevante Rolle, indem sie die fibrillären Kollagene mit anderen Matrixkomponenten verknüpfen

(Van der Rest and Garrone, 1991). Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion von Kollagentyp IV mit Kollagentyp II (s. unten).

1.5.2 Kollagene und ihre Bedeutung im hyalinen Gelenkknorpel

Im Gelenkknorpel kommen verschiedene Kollagentypen vor, v.a. die Kollagentypen II, VI, IX, X und XI (Buckwalter and Mankin, 1997). Hierbei macht beim Erwachsenen der Kollagentyp II 90-95 % aus und stellt somit den am häufigsten vorkommenden und wichtigsten Kollagentyp im gesunden, humanen Gelenkknorpel dar (Mayne, 1989).

Kollagentyp II gehört zu den Fibrillen-bildenden Kollagenen. Es setzt sich aus einer homotrimeren Tripelhelix ($[\alpha 1(\text{II})]_3$) zusammen und wird klassischerweise von differenzierten Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels exprimiert (Aigner et al., 1993, Benya et al., 1978, Benya and Shaffer, 1982, Schnabel et al., 2002). Die Kollagentyp II - Fibrillen bilden den Hauptteil des oben beschriebenen, querverknüpften Kollagenfasernetz im hydrodynamischen Dämpfungssystem (Buckwalter and Mankin, 1997). Zusammen mit Kollagentyp IX, ein heterotrimeres Kollagen aus der Gruppe der FACITs, und Kollagentyp XI, ein heterotrimeres, fibrillen-bildendes Kollagen, bilden die Kollagentyp II - Fibrillen querverknüpfte Heteropolymere aus (Eyre, 2002, Diab et al., 1996, Gelse et al., 2003). Innerhalb des Kollagengerüsts stabilisieren sich die drei Kollagentypen gegenseitig in der Ausbildung der Fibrillen und sind somit essentiell für die Druckelastizität des Knorpels (Diab et al., 1996, Buckwalter and Mankin, 1997). Die einzigartige Wasserbindungsfähigkeit des hyalinen Knorpels lässt sich dagegen durch den hohen Anteil an der Aminosäure Hydroxylysin und dem hohen Anteil an Glucosyl- und Galactosylresten im Kollagentyp II-Protein erklären, wodurch die Kollagentyp II-Fasern sehr gut mit Proteoglykanen interagieren können (Gelse et al., 2003). Die zunehmende Hydrierung des Knorpelgewebes im Zuge einer OA deutet daher auf eine Störung der Interaktion innerhalb dieses Netzwerks hin (Mayne, 1989).

Ein weiteres Kollagen im hyalinen Gelenkknorpel stellt der Kollagentyp III dar. Es besteht aus einer homotrimeren Tripelhelix ($[\alpha 1(\text{III})]_3$) (Van der Rest and

Garrone, 1991) und kommt v. a. in Geweben vor, die ebenfalls den Kollagentyp I beinhalten (mit Ausnahme von Knochen und Sehnen) (Rossert, 2002). Außerdem ist es ein wichtiger Bestandteil retikulärer Fasern (Gelse et al., 2003). Hyaliner Gelenkknorpel stellt eine weitere Ausnahme dar, denn sowohl in gesunden, als auch in osteoarthrotisch verändertem Gelenkknorpel wurde der Kollagentyp III zu einem geringen, aber signifikanten Anteil nachgewiesen (Young et al., 1995, Aigner et al., 1993, Wotton and Duance, 1994), obwohl der Kollagentyp I im gesunden Gelenkknorpel physiologisch nicht vorkommt. Im hyalinen Gelenkknorpel ist Kollagentyp III mit Kollagentyp II-Fibrillen assoziiert (Young et al., 2000, Wu et al., 1996, Wotton and Duance, 1994) und spielt vermutlich bei Regenerationsversuchen nach Matrixschäden eine Rolle (Eyre, 2002, Wotton and Duance, 1994, Wu et al., 2010).

Ein weiterer Bestandteil der hyalinen Knorpelmatrix ist der Kollagentyp VI, der zu den mikrofibrillären Kollagenen zählt, welche feine Netzstrukturen bilden und in nahezu jedem Gewebe vorkommen (Gelse et al., 2003). Er besteht aus einer heterotrimeren Tripelhelix ($\alpha 1(IV)\alpha 2(IV)\alpha 3(IV)$) (Van der Rest and Garrone, 1991). Kollagentyp VI kommt im hyalinen Knorpel exklusiv in der PZM der Chondrozyten vor (Poole et al., 1988) und stellt deren wichtigsten Bestandteil dar (Söder et al., 2002). Kollagentyp VI besitzt vermutlich zwei verschiedene Funktionen: Zum einen stabilisiert es die PZM durch Verknüpfungen zum radialen Kollagennetzwerk, zum anderen dient die PZM und v. a. Kollagentyp VI durch spezielle Oberflächenrezeptoren als Mediator zwischen der interterritorialen Matrix und den Chondrozyten. Somit stellt Kollagentyp VI eine funktionelle Beziehung zwischen den Chondrozyten, ihrer PZM und der sie umgebenden EZM im adulten hyalinen Knorpel her (Poole et al., 1992).

Kollagentyp I ist das am weitesten verbreitete Kollagen im menschlichen Körper und kommt v. a. in Knochen, Sehnen, Haut und vielen anderen Geweben vor (Van der Rest and Garrone, 1991, Gelse et al., 2003, Wu et al., 2010). Es besteht aus einer heterotrimeren Tripelhelix ($[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$) (Van der Rest and Garrone, 1991). Im gesunden hyalinen Gelenkknorpel ist Kollagentyp I nicht auffindbar (Gelse et al., 2003, Wu et al., 2010). Es wird jedoch sowohl von sich dedifferenzierenden Chondrozyten exprimiert (Benya et al., 1978, von der Mark

et al., 1977, Lefebvre et al., 1990), als auch vermehrt in osteoarthrotischen Knorpel gefunden (Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004).

1.6 Bisheriger Therapiemöglichkeiten bei Osteoarthrose-erkrankten Kniegelenken

Da Arthrose nach dem heutigen Kenntnisstand nicht heilbar ist, zielt die momentane Arthrose-Therapie v.ba. auf Schmerzreduktion und möglichst lange Erhaltung der Gelenkfunktion ab (Felson et al., 2000, Robert-Koch-Institut, 2013). Die konservative Therapie setzt sich aus nichtmedikamentösen Therapieansätzen (Physio-, Ergo- und physikalische Therapie, Gewichtsreduktion, Anpassung der Lebensführung), sowie aus der medikamentösen Schmerz- und antiinflammatorischen Therapie zusammen (AWMF, 2009, Jordan et al., 2003, Robert-Koch-Institut, 2013). Diese erfolgt nach dem Stufenschema der WHO. Nähere Informationen können an entsprechender Stelle nachgelesen werden, z. B. auf der Homepage der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AKDAE, 2008)). Eine operative Therapie kommt v. a. bei Patienten mit therapierefraktären Schmerzen oder starken Einschränkung im alltäglichen Leben in Frage (AWMF, 2009). Hierbei kann, je nach Ausmaß des Schadens, gelenkerhaltend oder gelenkersetzend operiert werden. Generell sollte ein möglichst langer Gelenkerhalt dem Gelenkersatz bevorzugt werden (Bleß and Kip, 2016). Knorpelschäden werden im Allgemeinen nach der ICRS-Einteilung klassifiziert (Brittberg, 2000), die eine Erweiterung der vierstufigen Outerbridge-Klassifikation (1961) darstellt. Die gelenkerhaltenden Operationsmethoden kommen v. a. bei fokal begrenzten Knorpelschäden zum Einsatz. Hierzu zählen arthroskopische Methoden (Lavage (Gelenkspülung), Shaving (Knorpelglättung), Debridement), knochenstimulierende Techniken (Knochenanbohrung, Mikrofrakturierung, Abrasionsarthroplastik), sowie Gelenkflächenwiederherstellungen (Autologe Chondrozytentransplantation (ACT), Osteochondrale Chondrozytentransplantation (OCT)) und die gelenknahe Umstellungsosteotomien (Robert-Koch-Institut, 2013, Niemeyer et al., 2013, Hunziker, 2002).

Ist der Knorpelschaden so groß, dass weder konservative Therapien schmerzlindernd wirken, noch eine gelenkerhaltende Therapie den Knorpelschaden beheben könnte, kommt eine gelenkersetzende Operation in Frage, dabei ist v. a. der subjektive Leidensdruck des Patienten ausschlaggebend (Jordan et al., 2003, AWMF, 2009). Hierbei wird das menschliche Kniegelenk durch ein künstliches Ersatzgelenk (Endoprothese) ausgetauscht. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (s. AWMF-Leitlinien). Zumeist erfolgt ein vollständiger Ersatz des Gelenks (TEP = totale Endoprothetik) durch eine „Bikondyläre Oberflächenersatzprothese“ mit oder ohne Patellarersatz. Bei dieser Methode werden die zerstörten Gelenkgleitflächen, die Menisken und Teile des subchondralen Knochens vom Femur und der Tibia abgesetzt und durch Oberflächenprothesen, die im Knochen verankert werden, ersetzt. Die Muskulatur und der Bandapparat werden nach Möglichkeit erhalten (Bleß and Kip, 2016, Wirtz, 2010).

1.7 Bedeutung der Zellform

Bereits während der embryonalen Entwicklung sowie auch bei der Geweberegeneration finden viele Prozesse statt, die die Zellform verändern und hierdurch die Struktur und die Funktion des betreffenden Gewebes beeinflussen (Manasek et al., 1972, Yang et al., 1999). Wenn sich Stammzellen in Richtung der verschiedenen Zelllinien differenzieren, untergehen sie einer enormen Änderung ihrer Zellform: osteogene Zellen nehmen z. B., sobald sie anfangen Matrix zu synthetisieren, eine abgeflachte Form an, während chondrogene und adipogene Zellen sich frühzeitig abrunden (Gao et al., 2010). Weiterhin ist bekannt, dass die Zellform u. a. Einfluss auf die DNA-Synthese und Zellteilung (Folkman and Moscona, 1978), die Apoptose (Chen et al., 1997), die Differenzierung der Zellen (Watt et al., 1988), sowie auf die Morphogenese von Organen hat (Nelson et al., 2006). Die molekularen Grundlagen für diese, durch die Zellform angeregten Effekte sind jedoch noch nicht vollständig geklärt (Gao et al., 2010).

Einleitung

Die Geometrie einer einzelnen Zelle entsteht aus dem Kräftegleichgewicht zwischen der intern generierten Zytoskelettkontraktilität und den externen biomechanischen Kräften (Halder et al., 2012, Sun et al., 2012). Die internen Kräfte sind sowohl proportional zur zellulären Adhäsionskraft, als auch zu den elastischen Materialeigenschaften der umgebenden EZM (Sun et al., 2012). Dies dient als Erklärungsansatz wie externe biophysikalische Signale in der Lage sind die Zellform durch ihre Effekte auf die Zytoskelettkontraktilität zu steuern. Dieses Wissen kann potenziell genutzt werden, um durch die Kontrolle der Zellform via biophysikalische Signale das Verhalten von Zellen, in diesem Fall von Chondrozyten, zu kontrollieren.

Ziel vieler Studien und auch dieser Arbeit ist es, das Wissen über die Bedeutung der Zellform für die mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf humane Chondrozyten zu übertragen. So ist bereits bekannt, dass Chondrozyten, sobald sie aus dem Knorpel isoliert und in Monolayer-Kulturen eingebracht werden, innerhalb einiger Tage ihre Zellform von polyglonal/rund in eine abgeflachte, amöboid-ähnliche Form ändern (von der Mark et al., 1977). Gleichzeitig regulieren die Knorpelzellen ihre Chondrozyten-spezifischen Marker runter: Es findet ein Wechsel in der Genexpression von dem für sie typischen Kollagentyp II zum knorpelunphysiologischen Kollagentyp I statt (Müller et al., 1977, Gay et al., 1976, Mayne et al., 1976, Benya et al., 1978). In Anbetracht dessen soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich dieses Wissen auch auf arthrotische Chondrozyten übertragen lässt und ob es über die Variation mechanischer Stimuli möglich ist, das Expressionsprofil erkrankter und gesunder Chondrozyten nachzustellen, bzw. zu variieren.

1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zellgeometrie humaner isolierter OA-Chondrozyten durch das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen zu kontrollieren und hierdurch ihr phänotypisches Genexpressionsprofil zu modulieren, um somit über die Kontrolle der Zellgeometrie den Phänotyp humaner OA-Chondrozyten *in vitro* zu re-programmieren. Die vorliegende Arbeit war in die folgenden Teilziele geordnet:

- Das erste Ziel war es, die Frage zu beantworten, ob ein Zusammenhang zwischen der Zellgeometrie einzelner superfizieller Chondrozyten und der übergeordneten superfiziellen räumlichen Organisationsform („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) der entsprechenden Chondrozyten bestand, und ob eine vollständige Übersicht über die Morphologie der Chondrozyten im Gewebe (3.1.1), im enzymatisch isolierten Zustand (3.1.2) und nach dem Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen (3.1.3) erarbeitet werden kann.
- Das zweite Ziel war es, die Frage zu beantworten, ob Zellgeometrien durch biomimetische Mikroadhäsionsflächen organisationsspezifisch reproduzierbar sind.
- Das dritte Ziel war es, die Frage zu beantworten, ob der Phänotyp superfizieller, isolierter Chondrozyten über die externe Kontrolle der geometrischen Zellmorphologie durch Mikroadhäsionsflächen kontrolliert werden kann. Hier lag der Fokus auf der mRNA-Expression der Typ I, II, III und VI Kollagene, da diese für den Phänotyp humaner OA-Chondrozyten besonders relevant sind.

Hierdurch wäre es theoretisch möglich, OA-Chondrozyten durch die Veränderung ihrer geometrisch-charakteristischen Eigenschaften (s. Kapitel 3.1.1) in einen weniger ausgeprägten OA-Phänotyp und möglicherweise in einen chondrogenen Phänotyp zu überführen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Spenderkollektiv

Der hyaline Gelenkknorpel stammte von Patienten mit Osteoarthrose-veränderten Kniegelenken, bei denen die erkrankten Gelenkanteile durch eine Totalendoprothese (Knie-TEP) in der BG Unfallklinik Tübingen oder im Winghofer Medicum Rottenburg ersetzt wurden. Hierbei fielen Knorpel-Knochen-Fragmente, die sowohl von den medialen und lateralen Femurkondylen als auch von den Interkondylarregionen stammen, als Operations-Reste an. Diese wurden als Gewebespende zur Verfügung gestellt. Somit barg die Gewinnung des Spendermaterials für die Patienten kein zusätzliches Risiko. Die Knorpel-Knochen-Fragmente wurden nach der Entnahme im Operationssaal in sterile Probenbecher mit DMEM-Medium gelegt und bis zur Verarbeitung bei +4 °C gelagert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Proben vital und steril blieben. Das Spenderkollektiv setzte sich aus 38 Frauen im Alter von 50-91 Jahren und 23 Männern im Alter von 52-82 Jahren zusammen.

2.1.2 Chemikalien

Table 1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Hersteller	Produktname	Details	CAS-/Referenznummer
Clontech	Advantage RT-for-PCR kit (100x)	Enthält: - 5x Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂) - Oligo (dT) ₁₈ Primer, 20 µM - Random Hexamer Primer, 20 µM - MMLV Reverse Transcriptase, 200 Units/µl - Recombinant RNase Inhibitor - dNTP Mix, 10 mM each	639506
gibco by life technologies	DMEM (1x) = Dulbescos Modified Eagle Medium	[+] 4,5 g/l D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate 500 ml	41966-029

gibco by life technologies	Fungizone Antimycotic	Amphotericin B 250 µg/ml 50 ml	15290-026
gibco by life technologies	Penicillin-Streptomycin	[+] 10 000 Units/ml [+] 10 000 µg/ml	15140-122
Life technologies	Calcein-AM	1 ml	C3099
QIAGEN	Qiagen RNeasy Mini Kit (250)	Enthält: - RPE-Puffer - RW1-Puffer - RLT-Puffer	74106
QIAGEN	RNase-free DNase Set (50x)	Enthält: - DNase - RDD-Puffer	79254
Roche	Dispase II	5 x 1 g ≥ 0,8 Units/mg Protein	04942078001
Roche	PCR grade water	0,5 l	0303640103
Roche	Propidiumiodid	20 ml (0,5 mg/ml)	11348639001
Roche	LightCycler 480 Probes Master	500 x 20 µl Reaktionen	04707494001
Roche	RPL13A TaqMan Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 157	04694449001
Roche	GAPDH TaqMan-Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 60	04688589001
Roche	COL1A2 TaqMan-Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 79	04689020001
Roche	COL2A1 TaqMan-Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 50	04688112001
Roche	COL3A1 TaqMan-Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 131	04694155001
Roche	COL6A1TaqMan-Sonde	Universal Probe Library Sondennr. # 80	04689038001
SAV-Liquid Production	Ethanol	Ethanol 99 %, vollständig vergällt	ETO-5000-99-1
Sigma-Aldrich	Collagenase Type XI from Clostridium histolyticum	100 mg	C7657
VWR Prolabo Chemicals	AnalaR NORMA-PUR Ethanol absolut	5 l	64-17-5

Material und Methoden

Gibco by life technologies	DMEM, low glucose	[+] 1 g/l D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate 500 ml	11885084
Gibco by life technologies	PBS	500 ml	14190144

500 ml DMEM-Medium (4,5 g Glucose) wurden beim Anbrechen der Flasche mit 6 ml Fungizone und 10 ml Penicillin-Streptomycin gemischt. In dieser Arbeit wurde die Verwendung von „Medium“ bzw. „DMEM-Medium“ dem leichteren Lesen zuliebe mit der Kombination dieser drei Komponenten gleichgesetzt.

Das Chondrozyten-Medium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 250 ml Ham's F12
- 250 ml DMEM, low glucose
- 50 ml FCS
- 10 ml Penicillin-Streptomycin
- 6 ml Fungizone
- 500 µl Phosphitan (25 mg/ml)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Biopsiestanze 4 mm	Pfm medical, Köln/Dt.
Blue Caps (10 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen/Dt.
Eppendorf-Cups (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg/Dt.
Kanülen – Sterican Gr. 18	B. Braun, Melsungen/Dt.
Magnetrührfische	Chemoline
Light Cycler Multiwell Plate 96	Roche
Petrischalen (145/20 mm, 94/16 mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen/Dt.
Pinzetten (chirurgisch, anatomisch)	Fa. Aesculap, Tuttlingen/Dt.

Pipettenspitzen: Eppendorf Research <i>plus</i> (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Serological Pipet (5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg/Dt. Becton Dickinson, Franklin Lakes/ USA
Rasierklingen	Müller Drogerie
Schraubbecher 100 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht/Dt.
Skalpell (No. 21)	FEATHER Safety Razor Co., Ltd/Japan
Spatel	Fa. Aesculap, Tuttlingen/Dt.
96-Well-Platten, flach	Greiner bio-one, Frickenhausen/Dt.
Zellkammer CYTOOchips	Cytoo
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen/D

2.1.4 Gerätschaften

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Gerätschaften

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Laboport, Neuberger, Freiburg/Dt.
Abzug	Prutscher, Österreich
Dampfsterilisator HIKLAVEC HV-50L	HMC Europe, Tüßling/Dt.
Gefrierschrank -72 °C	GFL
Gefrierschrank -24 °C	Liebherr Premium, Dt.
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Dt.
Kühlschrank +4 °C	Severin, Dt.
Light Cycler 480 II	Roche, Schweiz
LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss GmbH, Dt.
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Inc., Thermo Scientific; pecLab, Erlangen/Dt.
Neubauer Zählkammer improved	Brand GmbH, Wertheim/Dt.
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg/Dt.
Magnetrührplatte - RH basic	IKA, Staufen/Dt.
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt/Dt.
Schneidevorrichtung (Edelstahlblock mit 300 µm Vertiefung und 4 mm Durchmesser auf Hartwachsunterlage)	Laborvorrichtung, hergestellt von Sina Bast

Material und Methoden

Sterilbank	BDK; Luft- und Raumtechnik GmbH, Dt.
Thermocycler UNO II	Biometra, Göttingen/Dt.
Vortexer (Reax top)	Heidolph Instrument GmbH, Dt.
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg/Dt.
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg/Dt.
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg/Dt.

2.1.5 Software

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Softwares

Software	Herausgeber
Axio Vision 4.8.	Carl Zeiss GmbH, Dt.
Endnote X7.2	Thomson Reuters, USA
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, USA
Light Cycler® 480 SW 1.5.1	Roche, Schweiz
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, USA
NanoDop 1000 V 3.8.1	Thermo Fischer Scientific, USA
SigmaPlot Notebook 11.0	Systat Software Inc., Erkrath/Dt.
Snipping tool	René Zeidler – Windows Freeware

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung der Gelenkknorpel-Proben

Alle wiederverwendbaren Instrumente, wie z. B. Pinzetten, Spatel und Schneideblock, wurden vor Gebrauch für 2,5 h im Dampfsterilisator bei +120 °C sterilisiert. Die Rasierklingen und die Unterlage der Schneidevorrichtung aus Hartwachs wurden für 15 min in 100 %-igem Ethanol desinfiziert. Die Verarbeitung der Patientenproben erfolgte in der Sterilbank, wobei bei allen Arbeitsschritten stets darauf geachtet wurde, dass die Knorpeloberflächen mit DMEM-Medium benetzt waren und nicht austrocknen konnten.

Die Knorpel-Knochen-Fragmente wurden aus den Probenbechern in mit DMEM-Medium gefüllte Petrischalen überführt und zunächst makroskopisch hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur untersucht. Anschließend wurde der Knorpel mit einem Skalpell vom subchondralen Knochen abgetrennt und zur weiteren Verarbeitung in frisches Medium überführt. Aus den abgetrennten Knorpelstücken wurden mit Hilfe von Biopsiestanzen standardisierte Knorpelzylinder mit einem Durchmesser von 4 mm herausgestanzt. Diese konnten makroskopisch weiterhin der ehemaligen Gelenkoberfläche bzw. der subchondralen Unterseite zugeordnet werden, da die Gelenkfläche durch den längeren Mediumkontakt blassrosa verfärbt war, während die subchondrale Unterseite weißlich schimmerte. Um Knorpeldiscs der superfiziellen Zone zu erhalten, wurden von den Knorpelzylindern die obersten 300 µm mit einer Schneidevorrichtung und einer Rasierklinge abgeschnitten: Die Schneidevorrichtung aus Edelstahl weist eine 4mm breite und 300 µm tiefe runde Vertiefung auf. Die Knorpelzylinder wurden mit der ursprünglichen Gelenkoberfläche nach unten in die Vertiefung gelegt, mit einer Pinzette festgehalten und der überstehende Zylinder mit einer Rasierklinge abgetrennt. Die abgeschnittenen Knorpeldiscs wurden bis zur weiteren Verarbeitung in Eppendorf-Cups mit frischem DMEM-Medium verwahrt, der restliche Knorpel wurde verworfen.

2.2.2 Chondrozytenfärbung

2.2.2.1 Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM)

Für die Klassifizierung der Chondrozyten wurden die Knorpeldiscs mit dem grün-fluoreszierenden, unselektiven Lebendfarbstoff Calcein-AM gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop LSM 510 betrachtet. Für die Färbung wurde Calcein-AM mit DMEM-Medium im Verhältnis 1:1000 verdünnt (Arbeitskonzentration 1 µl Calcein-AM / 1 ml DMEM-Medium) und für jede Knorpeldisc 150 µl Färbelösung pro Well in eine 96er-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Knorpeldiscs in die Färbelösung gegeben und für 30 min bei +37 °C und lichtgeschützten Verhältnissen inkubiert.

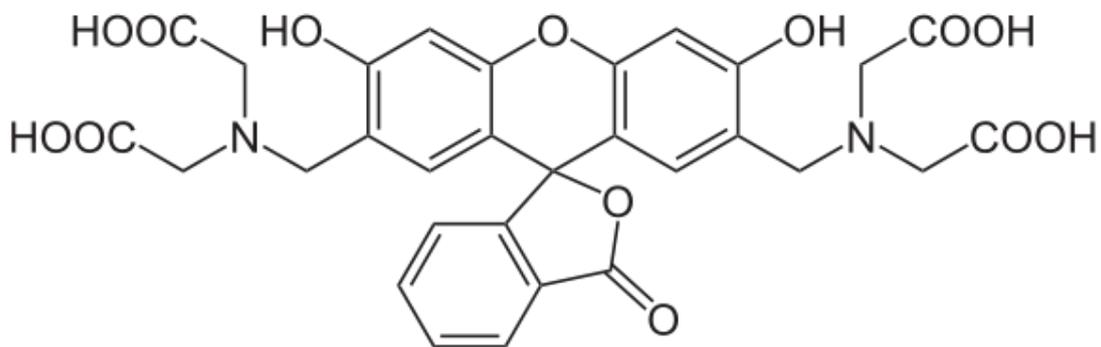


Abb. 9 Planare Darstellung des Calcein-Moleküls (<https://de.wikipedia.org/wiki/Calcein>; Abruf: 12.10.2016).

Das Calceinmolekül besitzt mehrere Carboxygruppen, wodurch der Farbstoff als Anion hydrophil ist und somit die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren kann. Damit Calcein in die Zelle aufgenommen werden kann, liegt es zunächst als unpolarer Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) vor. Bei Calcein-AM sind vier Carboxygruppen mit unspezifischen Resten und zwei Hydroxygruppen mit Essigsäure verestert, wodurch das Molekül seine Hydrophilie verliert. Außerdem liegt die fünfte Carboxygruppe als Laktone vor. Hierdurch wird die vorzeitige Chelatbildung mit extrazellulärem Calcium verhindert. Das unpolare Calcein-AM kann durch die Zellmembran lebender Zellen transportiert werden. Im Zytoplasma werden die funktionellen Gruppen durch unspezifische Es-

terasen enzymatisch abgespalten, wodurch aus Calcein-AM wieder Calcein entsteht. Als polares Molekül kann Calcein die Zelle nicht mehr verlassen und reichert sich im Zytoplasma an. Da die Laktonbindung ebenfalls gespalten wird, bilden Calcein und intrazelluläres Calcium einen Chelatkomplex. Dieser Komplex resultiert bei Anregung mit Licht in einer grünen Fluoreszenz. Als Fluorescein-Derivat weist Calcein ein Anregungsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 517 nm auf. Bei Calcein-AM handelt es sich also um einen Lebendfarbstoff, da tote Zellen keine aktiven Esterasen mehr besitzen und somit das Lakton nicht aufgespalten werden kann (Scott, 2003, Haugland, 2002).

2.2.2.2 Propidiumiodid (PI)

Propidiumiodid (PI) ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der in DNA interkaliert, sich also in die Doppelhelix einlagert. PI weist eine geringe Membranpermeabilität auf und kann nur die Membran toter Zellen durchdringen, da diese in der Regel Perforationen aufweisen. Daher dient der gemeinsame Einsatz von Calcein-AM und PI zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen. Die Verdünnung und Anwendung erfolgte analog zu Calcein-AM (s. Kapitel 2.2.2.1). Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 590 nm. Bei DNA-Interkalation verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 535 nm und das Emissionsmaximum zu 617 nm (Haugland, 2002).

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Zellorganisation

Die Analyse der Knorpeldiscs in Bezug auf die räumliche Zellorganisation superfizieller Chondrozyten erfolgte mit dem Auflichtmikroskop LSM 510 der Firma Zeiss und der Software AxioVision 4.8.2. Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich die Eigenschaft bestimmter fluoreszierender Stoffe zu Nutze, kurzwellig sichtbares Licht bei einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren, und die Energie teilweise in langwelliger Strahlung zu emittieren, also abzustrahlen. Damit das zu untersuchende Objekt unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar

wird, müssen dem Präparat spezifische Fluorochrome, z. B. Calcein-AM, zugefügt werden. Erst dadurch erhält das Präparat die notwendige Sekundärfluoreszenz, d. h. es wird erst durch die Anregung des Fluorochroms und die darauffolgende Abstrahlung sichtbar. Ihre Absorptionsmaxima liegen im hinreichend langwelligen Spektralbereich, damit die Emission im sichtbaren Licht erfolgt (Spektrum, 1999).

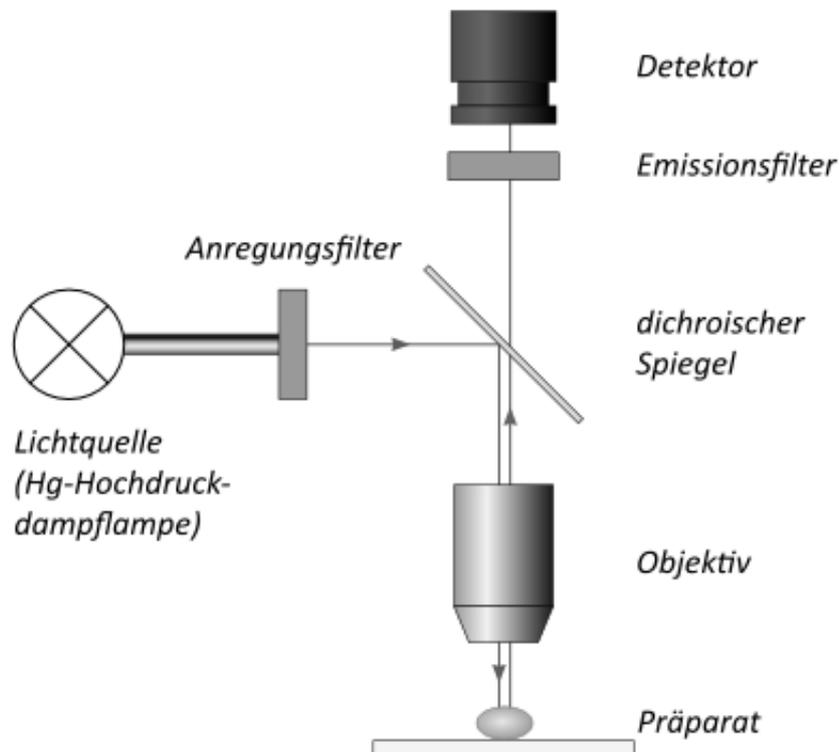


Abb. 10 Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskops. Die eingezeichneten Pfeile beschreiben den Weg des ausgesendeten Lichts. Die genaue Erläuterung des Fluoreszenzmikroskops ist in folgendem Fließtext ersichtlich. (<https://lp.uni-goettingen.de/get/image/6753>; Abruf: 07.10.2016)

Als Lichtquelle dienen dem Fluoreszenzmikroskop Quecksilberhochdrucklampen. Der Anregungsfilter schält den UV-Anteil der Lichtquelle aus und sendet nur das Erregerlicht, also die Anregungsstrahlung, weiter. Dieses trifft auf einen dichroischen Farberteilerspiegel, welcher Erregerlicht kleiner Wellenlängen ($\lambda < 420\text{nm}$) fast vollständig reflektiert und nur Erregerlicht großer Wellenlängen ($\lambda > 420\text{nm}$) durch das Objektiv zum Präparat leitet. Beim Auflichtfluoreszenzmik-

roskop dient das Objektiv gleichzeitig als Kondensator. Die Fluorochrome im Präparat werden angeregt und strahlen in einer größeren Wellenlänge ab. Zuletzt wird durch einen Emissionsfilter die intensivere Erregungsstrahlung abgefangen, sodass nur noch die Fluoreszenzstrahlung auf den Detektor, bzw. durch das Okular auf das Auge des Betrachters trifft (Spektrum, 1999).

Die Knorpeldiscs wurden für die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit der ursprünglichen Gelenkoberfläche nach oben liegend in eine 96-Well-Platte überführt und unter dem Mikroskop in eine spezielle Halterung eingespannt. Zur Übersicht und zur Einteilung in die räumlichen Organisationsformen wurde eine 10-fache Vergrößerung und der Lichtkanal mit der entsprechenden Wellenlänge für die Calceinfärbung verwendet. Die superfiziellen Zonen der Knorpeldiscs wurden zunächst über das „Eyepiece“, also über das Okular, betrachtet und den jeweils dominierenden räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ oder der diffus organisierten Anordnung zugeteilt. Falls sich eine Knorpeldisc als unbrauchbar rausstellte, z. B. weil die Knorpeldisc keine lebenden Chondrozyten aufwies oder weil die Knorpeldisc nicht eindeutig einer dominierenden räumlichen Organisationsform zugeordnet werden konnte, wurde sie verworfen. Von den meisten Proben wurden mehrere sogenannte „Snap-Shots“ (= Einzelaufnahmen) angefertigt. Diese dienten im weiteren Verlauf zur Analyse der Zellgeometrie der einzelnen Chondrozyten innerhalb einer räumlichen Organisationsform (s. Kapitel 2.2.6). Zusätzlich wurden mit der Zusatzkomponente „MosaiX“ exemplarische Mosaikaufnahmen einzelner Knorpeldiscs aufgenommen. Eine Mosaikaufnahme setzte sich aus mehreren Einzelbildern zusammen, in der Regel umfasste sie 5 x 5, bzw. 6 x 6 - Einzelbilder (s. Abb. 11). Für ein Mosaik wurde zunächst das passende Raster festgelegt, dann wurde die Belichtungszeit für die ganze Aufnahme, also für alle Bilder gemeinsam, bestimmt. Im nächsten Schritt wurde der Fokus für jedes Einzelbild manuell eingestellt. Anschließend fuhr das Mikroskop den festgelegten Bereich ab, fotografierte die Einzelbilder und setzte diese mit einem Überlappungsbereich von 5 % zu einem Gesamtbild, dem Mosaik, zusammen.

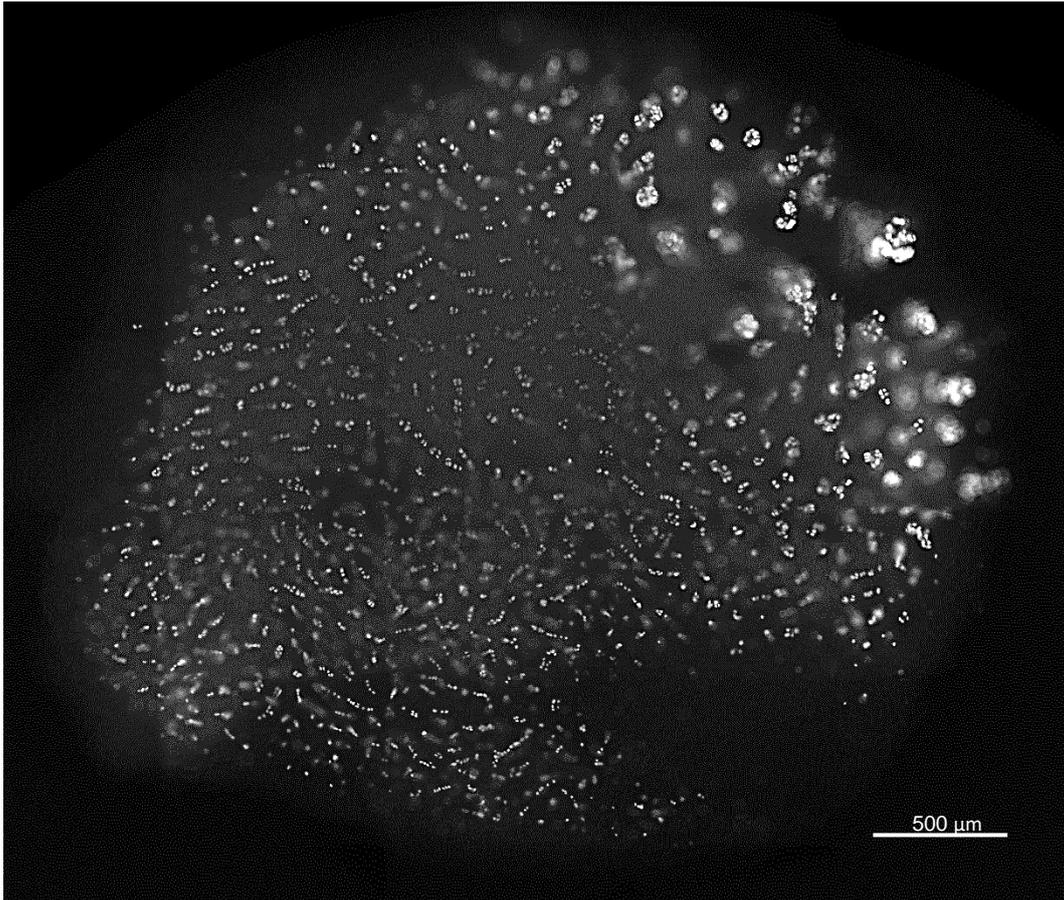


Abb. 11 Mosaikaufnahme einer superfiziellen Knorpeldisc. Das Mosaik setzt sich aus 5x5 - Einzelbildern zusammen und zeigt von links unten nach rechts oben den dynamischen Übergang der räumlichen Organisationsformen „Strings“ - „Doublestrings“ - „Small Clusters“ - „Big Clusters“ (Calcein-AM-Färbung, 10 x-Objektiv, LSM 510 Mikroskop, AxioVision 4.8.2).

Zur Analyse der Zellgeometrie isolierter Chondrozyten (s. Kapitel 2.2.4) wurde die mit Calcein-AM und Propidiumiodid gefärbte Chondrozytensuspension in eine 96-Well-Platte pipettiert, in die Mikrophalterung eingespannt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, damit die Chondrozyten auf den Well-Boden absinken konnten. Anschließend wurden von einem Well bei 10-facher Vergrößerung und mit den Lichtkanälen für Calcein und Propidiumiodid Mosaikaufnahmen angefertigt. Die Doppelfärbung der Chondrozyten diente zur Beurteilung der Vitalität der Knorpelzellen (s. Kapitel 2.2.2). Die Chondrozyten waren zu diesem Zeitpunkt nicht am Wellboden adhärent.

Die Analyse von Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen (s. Kapitel 2.2.7) erfolgte ebenfalls bei 10-facher Vergrößerung und mit der Doppelfärbung Calcein-AM und Propidiumiodid. Hierfür wurde der CYTOOchip in seiner Zellkammer unter dem Mikroskop eingespannt und es wurden sowohl Einzelbildaufnahmen mit einigen Chondrozyten als auch Mosaikaufnahmen zur Übersicht eines ganzen Zellchip-Areals abgelichtet.

2.2.4 Enzymatischer Knorpeldisc-Verdau

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Knorpeldiscs ihrer dominierenden räumlichen Organisationsform entsprechend sortiert und anschließend enzymatisch isoliert. Die Proben setzten sich pro räumliche Organisationsform aus der folgenden durchschnittlichen Anzahl an Knorpeldiscs zusammen (Mittelwert \pm Standardabweichung): „Strings“: $11,9 \pm 2,7$, „Doublestrings“: $13,7 \pm 2,3$, „Small Clusters“: $11,6 \pm 3,6$, „Big Clusters“: $8,6 \pm 2,6$, „Diffus“: $10,1 \pm 2,6$. Es wurde versucht möglichst reine Proben, d. h. ein Patient pro Probe, zu erhalten. Des Öfteren mussten jedoch mehrere Patientenproben gepoolt werden. Insgesamt wurden 87 Proben verarbeitet, hiervon waren 48 Reinproben und 39 gepoolte Proben.

Der enzymatische Verdau wurde in 2 ml Eppendorf-Cups wie folgt angesetzt:

- Chondrozyten-Medium: 1140 μ l
- Dispase II: 570 μ l
- Kollagenase XI: 286 μ l

Jedes Eppendorf-Cup enthielt einen Magnetrührfisch, um einen gleichmäßigen Verdau zu gewährleisten. Die Verdauansätze wurden bei $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und gleichmäßigem Rühren über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurde der Verdau gestoppt, indem die Eppendorf-Cups für 15 min bei 1500 rpm und $+7\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert wurden und der Überstand abgesaugt wurde. Das zurückbleibende Zellpellet wurde entweder für die mRNA-Extraktion in 350 μ l RLT-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (s. Kapitel 2.2.8) oder in 1 ml DMEM-Medium resuspendiert, um die Zellanzahl vor dem Einbringen in Zellkulturflaschen zu ermitteln (s. Kapitel 2.2.5).

2.2.5 Ermittlung der vitalen Chondrozytenanzahl

Die Anzahl vitaler Chondrozyten pro Milliliter Medium wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurden 20 µl der resuspendierten Chondrozyten im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau kann in tote Zellen eindringen, ist jedoch nicht in der Lage die Membran lebender Zellen zu passieren. So erscheinen tote Zellen unter dem Lichtmikroskop blau, während vitale Zellen unangefärbt bleiben und auf Grund der intakten Membran das Licht weiß reflektieren. Hierdurch kann eine Diskriminierung vitaler vs. toter Chondrozyten erfolgen.

Zur Kontrolle wurden pro Chondrozytenprobe zwei Neubauer-Zählkammern à vier Großquadrate ausgezählt.

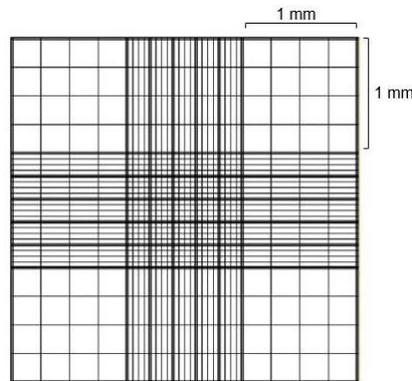


Abb. 12 Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer besteht aus insgesamt neun Großquadraten. Für die Auszählung der Chondrozyten werden die vier Eckquadrate verwendet, welche sich aus jeweils 16 Kleinquadraten zusammensetzen (<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>; Abruf: 12.09.2016, bearbeitet).

Die Neubauerkammer wurde wie folgt ausgezählt:

$$\frac{\text{Chondrozyten}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl Chondrozyten}}{\text{Anzahl Großquadrate}} * 10000 \frac{1}{\text{ml}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor entspricht gemäß der 1:1-Verdünnung dem Faktor 2. Der Faktor setzt sich aus den Maßen der Neubauer-Zählkammer und der Hochrechnung auf 1 ml zusammen: Die Kammertiefe der Neubauer-Zählkammer beträgt 0,1 mm, die Seitenlängen eines Großquadrats betragen jeweils 1 mm, d.h. ein Großquadrat besitzt ein Volumen von 0,1 mm³. 0,1 mm³ entsprechen 0,1 µl. Demnach entsprechen 0,1 µl * 10 000 = 1 ml.

Zur Verdeutlichung folgt ein Beispiel:

In den Quadranten wurde die folgende Anzahl vitaler Chondrozyten gezählt:

Tabelle 5 Beispielhafte Auszählung vitaler Chondrozyten in einer Neubauer-Zählkammer

Großquadrat	Anzahl vitaler Chondrozyten
1	7
2	5
3	8
4	9
Summe:	29

Berechnung der Zellzahl:

$$\frac{\text{Chondrozyten}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl Chondrozyten}}{\text{Anzahl Großquadrate}} * 10\,000 \frac{1}{\text{ml}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\frac{\text{Chondrozyten}}{\text{ml}} = \frac{29}{4} * 10\,000 \frac{1}{\text{ml}} * 2 = 145\,000 \frac{\text{Chondrozyten}}{\text{ml}}$$

In diesem Beispiel wurden also insgesamt 145 000 vitale Chondrozyten pro Milliliter isoliert. Da in den Versuchsreihen dieser Dissertation die Chondrozyten nach dem enzymatischen Verdau in 1 ml Medium resuspendiert wurden, entspricht die Anzahl vitaler Chondrozyten pro ml der Gesamtanzahl vitaler Chondrozyten pro Probe.

2.2.6 Analyse der Zellgeometrie

2.2.6.1 Analysesoftware ImageJ

Ein Großteil des Inhalts und der Grafiken des Kapitels 2.2.6 wurden mit der freundlichen Genehmigung von L. Schmid aus den Kapiteln 3.3 und 3.4 ihrer Bachelorarbeit mit dem Titel „Implementation und Verifikation einer effizienten, präzisen, reproduzierbaren und akkuraten automatischen Quantifizierungsmethode für zelluläre Morphologien“ übernommen, um gut geeignetes Bildmaterial zur Illustration des Sachverhaltes verwenden zu können (Schmid, 2016).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der superfiziellen Chondrozyten wurden mit Hilfe der Freeware ImageJ bzgl. ihrer Zellgeometrie analysiert. Das Programm wurde von Wayne Rasband in den USA entwickelt (Schneider et al., 2012) und wird vom National Institutes of Health (NIH) zum kostenlosen Download zur Verfügung gestellt (NIH). Die Software ist in Java implementiert und kann durch eigene Plugins und Macros erweitert werden, welche die vorhandenen Werkzeuge für die individuelle Anwendung ergänzen können. ImageJ unterstützt zahlreiche Bildformate und wird in vielen Labors, speziell in Biologie und Medizin angewendet (Burger and Burge, 2006). Für diese Arbeit wurde die Version 1.48v verwendet.

2.2.6.2 Shape Deskriptoren

Zur mathematischen bzw. geometrischen Beschreibung der Zellform wurden vier verschiedene Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity) verwendet, die in ImageJ berechnet werden können. Die folgenden Abbildungen wurden von L. Schmid mit Photoshop erstellt.

2.2.6.2.1 Aspect Ratio

Der Aspect Ratio beschreibt das Verhältnis zwischen Haupt- und Nebenachse (Major und Minor Axis) der über die Zelle gelegten Ellipse und ist damit ein Maß für die längliche Ausdehnung der Zelle.

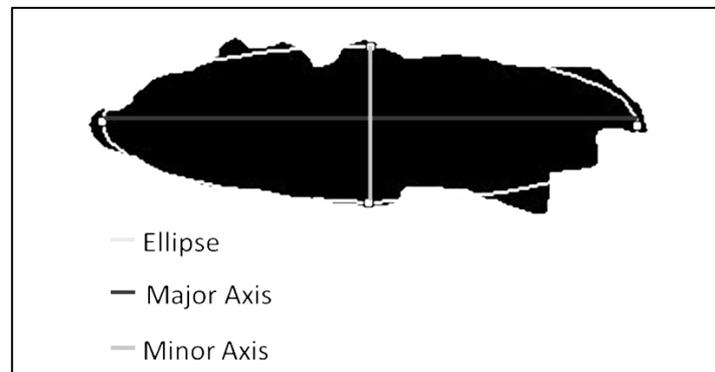


Abb. 13 Beispielhafte Zelle mit Darstellung einer Ellipse, die die Form der Zelle am passendsten umschreibt. Die Major Axis beschreibt die Hauptachse der Ellipse, die Minor Axis bezeichnet die Nebenachse.

Er wird mit folgender Formel berechnet: $\text{Aspect Ratio} = \frac{\text{Major Axis}}{\text{Minor Axis}}$

ImageJ nutzt für den Aspect Ratio die Abkürzung AR (ImageJ). Der Aspect Ratio kann Werte von 1 bis Unendlich annehmen, wobei 1 einen perfekten Kreis beschreibt (s. Abb. 14).



Abb. 14 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Aspect Ratio“. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft verschiedene Formen, von exakt kreisförmig bis zu einer länglichen Form, dargestellt. Anschließend wurden die Formen mit ImageJ in Bezug auf den Shape Deskriptor Aspect Ratio analysiert und die Werte im unteren Teil der Abbildung als Balkendiagramme dargestellt.

2.2.6.2.2 Roundness

Die Roundness ist ein Maß für die Rundheit einer Form. Sie berechnet sich aus:

$$\text{Roundness} = 4 * \frac{\text{Fläche}}{\pi * \text{Major Axis}^2}$$

Die Roundness nimmt ausschließlich Werte zwischen 0 und 1 an. Für einen Kreis beträgt die Roundness 1 und für ovalere Strukturen entsprechend weniger. ImageJ nutzt für die Roundness die Abkürzung Round (ImageJ). Die Roundness erlaubt ähnliche Aussagen wie der Aspect Ratio, reagiert aber empfindlicher auf Längung einer Struktur.

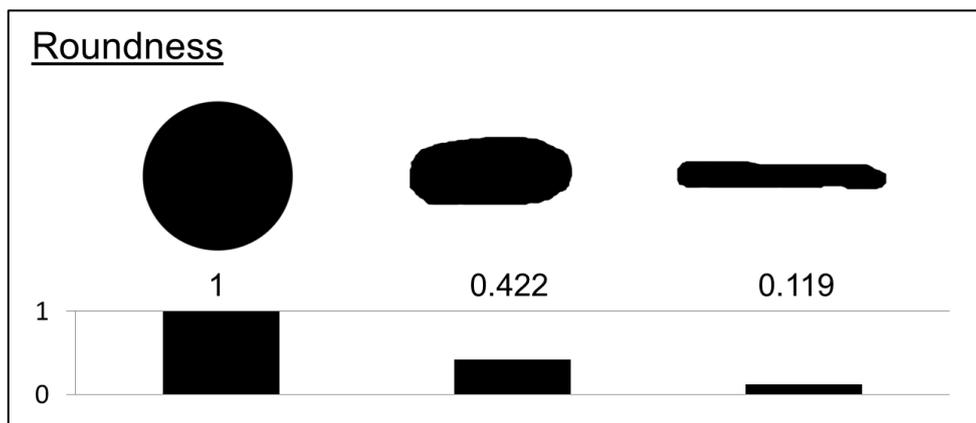


Abb. 15 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Roundness“. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft verschiedene Formen, von exakt kreisförmig bis zu einer länglichen Form, dargestellt. Anschließend wurden die Formen mit ImageJ in Bezug auf den Shape Deskriptor Roundness analysiert und die Werte im unteren Teil der Abbildung als Balkendiagramme dargestellt.

2.2.6.2.3 Circularity

Die Circularity beschreibt wie glatt der Rand einer Struktur ist. Die Formel lautet:

$$\text{Circularity} = 4\pi * \frac{\text{Fläche}}{\text{Umfang}^2}$$

Die Werte für die Circularity bewegen sich zwischen 0 und 1. Dabei beschreibt eine Circularity von 1 einen perfekten Kreis. Geht der Wert gegen Null, beschreibt er eine zunehmend mit Ein- und Ausbuchtungen behaftete Form. ImageJ nutzt für die Circularity die Abkürzung Circ (ImageJ). Die Circularity ist mit dem Vorhandensein von Membranprotrusionen, also Ausstülpungen der Zellmembran verbunden. Die Circularity reagiert empfindlicher auf kleine Ein- und Ausbuchtungen als die Solidity.

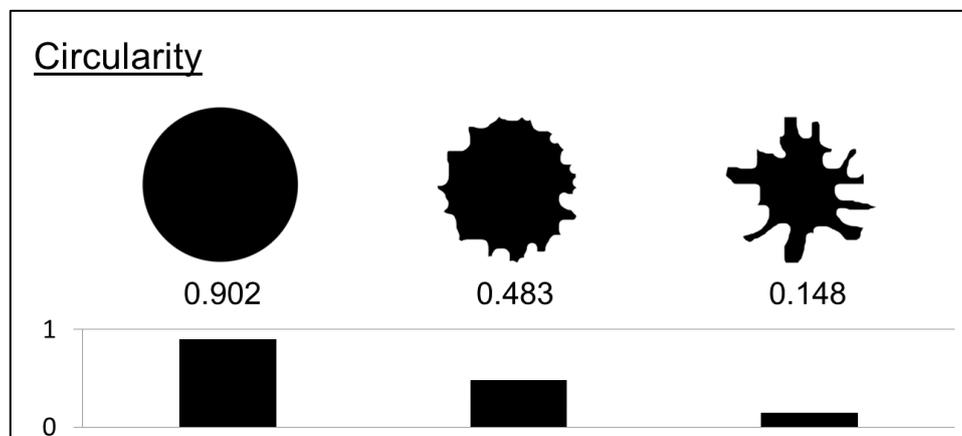


Abb. 16 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Circularity“. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft verschiedene Formen, von exakt kreisförmig ohne Einbuchtungen bis zu einer Form mit vielen Ein- und Ausbuchtungen, dargestellt. Anschließend wurden die Formen mit ImageJ in Bezug auf den Shape Deskriptor Circularity analysiert und die Werte im unteren Teil der Abbildung als Balkendiagramme dargestellt.

2.2.6.2.4 Solidity

Die Solidity beschreibt das Verhältnis der Gesamtfläche zu ihrer konvexen Hülle

$$\text{nach: Solidity} = \frac{\text{Fläche}}{\text{konvexe Hülle}}$$

Die konvexe Hülle ist die kleinstmögliche Fläche, mit der die zu untersuchende Form konvex umfahren werden kann (ImageJ):

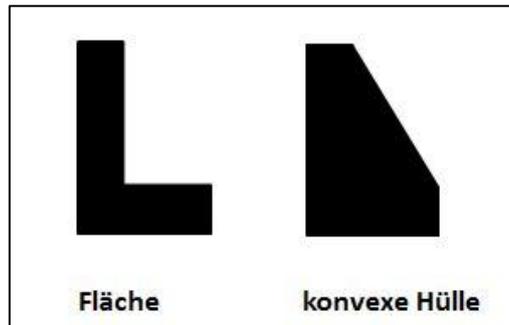


Abb. 17 Beispielhafte Darstellung einer konvexen Fläche und der dazugehörigen konvexen Hülle

Die Solidity nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Der Wert 1 beschreibt einen perfekten Kreis, kleinere Werte beschreiben eine zunehmend mit Ausläufern und Einbuchtungen behaftete Form. Somit ist eine kleine Solidity mit dem Vorhandensein vieler Membranprotrusionen verbunden. Die Solidity reagiert weniger empfindlich auf kleine Ein- und Ausbuchtungen als die Circularity.

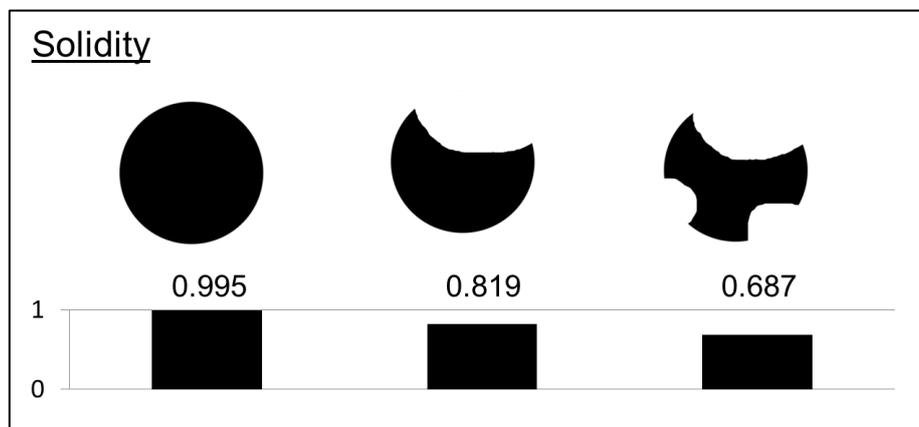


Abb. 18 Schematische Darstellung des Shape Deskriptors „Solidity“. Im oberen Teil der Abbildung sind beispielhaft verschiedene Formen, von exakt kreisförmig ohne Einbuchtungen bis zu einer Form mit vielen Ein- und Ausbuchtungen, dargestellt. Anschließend wurden die Formen mit ImageJ in Bezug auf den Shape Deskriptor Solidity analysiert und die Werte im unteren Teil der Abbildung als Balkendiagramme dargestellt.

2.2.7 Veränderung der Zellgeometrie durch das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen (CYTOOchips)

Die folgenden Arbeitsschritte wurden nur mit den Knorpelproben durchgeführt, deren Zellgeometrie nach enzymatischer Isolation durch das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen verändert werden sollte. Hierfür wurden Fibronectin-beschichtete Mikroadhäsionsflächen verwendet, da hierdurch die Zellgeometrie in spezifische Shapes verändert werden kann, ohne dabei eine Toxizitätswirkung auf die Chondrozyten zu haben!

Nach enzymatischer Isolation und Bestimmung der Zellanzahl wurde die Chondrozytensuspension mit 6 ml Chondrozytenmedium in eine Zellkulturflasche pipettiert und für sieben Tage bei +37 °C im Inkubator mit 5 % CO₂ gelagert. Dieser Arbeitsschritt führte dazu, dass die Chondrozyten anschließend auf den fibronectinbeschichteten Mikroadhäsionsflächen der CYTOOchips adhärerten. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein vorsichtiger Waschvorgang mit PBS sowie ein Mediumswechsel. Nach sieben Tagen wurden die Chondrozyten aus der Zellkulturflasche entfernt. Hierfür wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche abgezogen, die Flasche mit 5 ml PBS gewaschen, dann 3 ml 1x EDTA-Trypsin in die Zellkulturflasche pipettiert und diese für 5 min bei +37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Chondrozyten durch sanftes Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Waren bei lichtmikroskopischer Kontrolle noch viele Chondrozyten adhärent, wurde die Flasche für weitere 2 min bei +37 °C inkubiert und erneut beklopft. Nach spätestens 7 min wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 ml +4-6 °C kaltem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Bluecap überführt und bei 1500 rpm für 7 min bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Chondrozytenmedium resuspendiert. Abschließend erfolgte eine erneute Bestimmung der vitalen Zellanzahl (s. Kapitel 2.2.5). Im nächsten Schritt wurden 15 500 Chondrozyten auf die Mikroadhäsionsflächen des CYTOOchips aufgebracht. Für die hier beschriebenen Versuche wurden Starter-Chips der Firma Cytoo verwendet. Die Glas-Chips messen 16x16 mm und sind mit Mikroadhäsionsflächen aus Fibronectin in vier verschiedenen Mustern (H, Y, Crossbow und O) in jeweils drei verschiedenen Größen bedruckt.

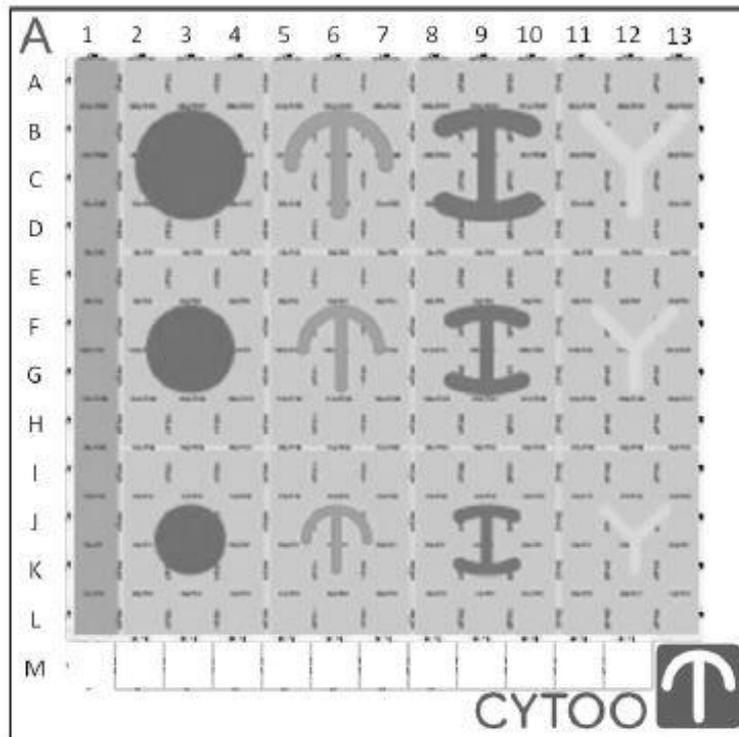


Abb. 19 Schematische Darstellung eines „CYTOOchips“. Die Quadrate in den Zeilen A-D sind mit je 9 x 9 großen Fibronektinschablonen bestückt, in den Zeilen E-H sind es je 14 x 14 mittelgroße Fibronektinschablonen und in den Zeilen I-L je 14 x 14 kleine Fibronektinschablonen. Die Zeile M dient zur Negativkontrolle und ist nicht mit Fibronektin beschichtet. Die Spalte 1 dient als Positivkontrolle und ist vollständig mit Fibronektin beschichtet, Spalten 2-4 sind mit dem Muster O bestückt, 5-7 mit dem Muster Crossbow, 8-10 mit dem Muster H und 11-13 mit dem Muster Y (<https://cytoo.com/micropattern-products/chips/cytoochips%E2%84%A2-starters-x18>; Abruf: 12.09.2016).

Da für die folgenden Versuche nur die Geometrien „H-Shape“ und „O-Shape“ benötigt wurden (s. Kapitel 3.1.3), wurden die Glas-Chips vor der weiteren Verarbeitung wie in Abb. 20 dargestellt präpariert:

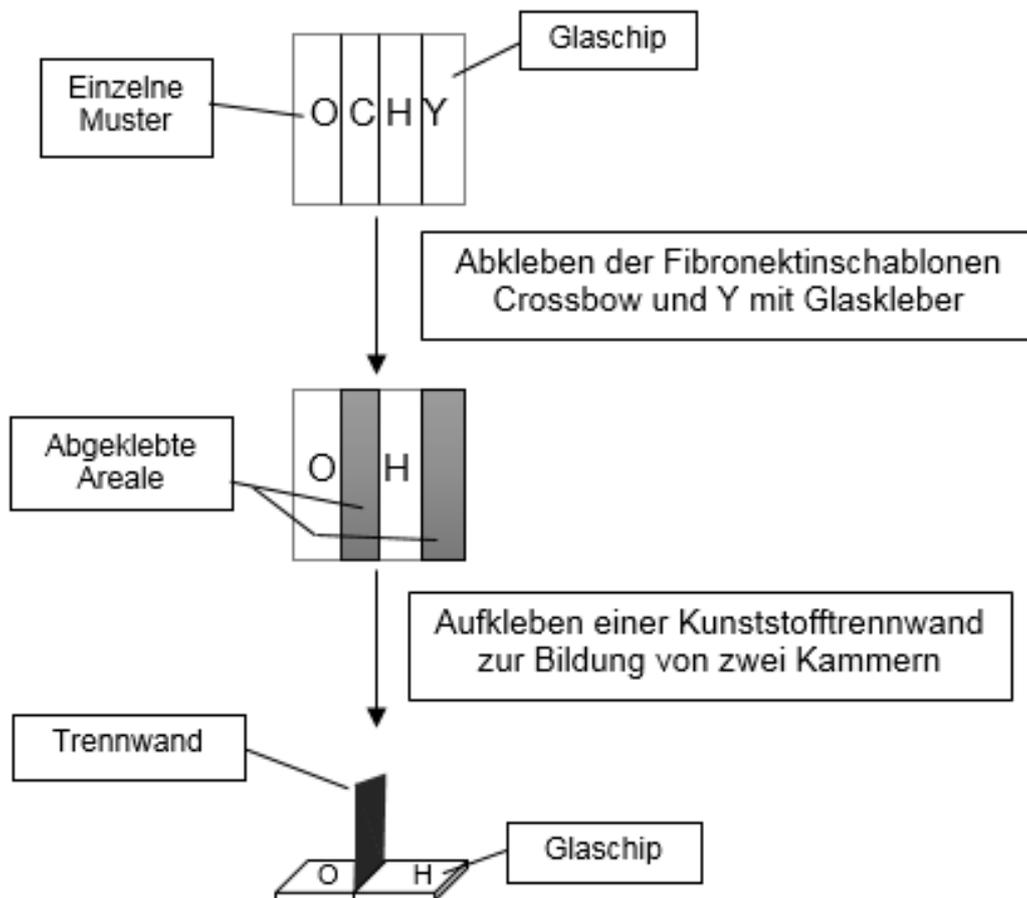


Abb. 20 Präparation des Fibronektin-beschichteten Glas-Chips („CYTOOchip“). Zunächst wurden die Spalten 1 (Kontrollbande), 5-7 (Crossbow) und 11-13 (Y) dem Schema in Abb. 19 entsprechend mit Glaskleber abgedeckt, so dass nur noch die Zell-schablonen „O“ und „H“ verfügbar waren. Anschließend wurde auf dem abgeklebten Bereich der Spalten 5-7 eine Kunststofftrennwand aufgebracht, um in der Zellkammer zwei separate Kammern zu erhalten. Die Trennwand wurde nach Zusammensetzen der Zellkammer im Randbereich durch Parafilm zusätzlich abgedichtet (eigens erstelltes Fließdiagramm).

Da die Präparation des Glas-Chips unsteril erfolgte, wurde dieser anschließend für 15 min unter UV-Licht sterilisiert, dann in die Zellkammer eingespannt und die eingebaute Trennwand am Randbereich durch Parafilm zusätzlich abgedichtet.

Wie in dem Schema in Abb. 20 zu erkennen ist, wurden zwei Muster („Crossbow“ und „Y“) vollständig abgeklebt, somit befinden sich auf den präparierten Glas-Chips also noch 7568 Schablonen mit dem Muster „H“ und 7568 Schablonen

nen mit dem Muster „O“. Daher wurden die Mikroadhäsionsflächen der zwei separierten Zellkammern zunächst mit jeweils 7750 isolierten Chondrozyten bestückt (Gesamtzahl: 15 500 isolierte Chondrozyten aus einer Zellpopulation).

Die Komponenten der verwendeten Zellkammer (Cytoo) wurden in folgender Abbildung aufgeführt:

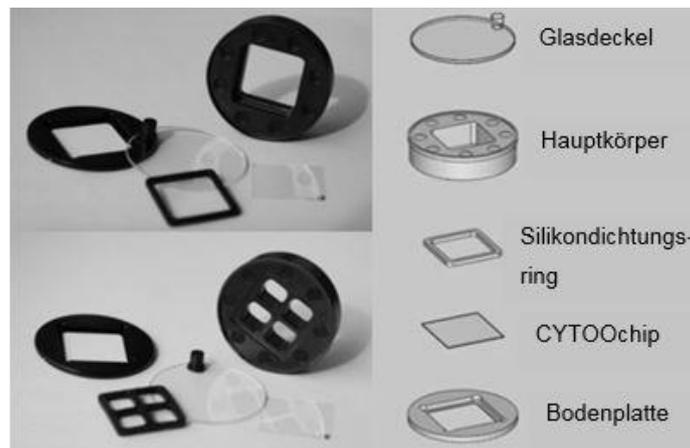


Abb. 21 Komponenten der Zellkammer (Cytoo). Links oben: Einräumige Zellkammer (hier modifiziert verwendet (durch Kunststofftrennwand in zwei Kammern aufgeteilt)); Links unten: Vierräumige Zellkammer; Rechts: Einzelkomponenten der Kammer (<https://cytoo.com/micropattern-products/accessories/cytoochambers>, Abruf: 12.09.2016; bearbeitet).

Der Glas-Chip wurde in den zwei erstellten Zellkammern mit angewärmten Chondrozytenmedium bedeckt und für zehn Minuten bei +37 °C vorgewärmt. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und der Glas-Chip mit insgesamt 15 500 Chondrozyten, also pro Kammer mit 7750 Chondrozyten, die der gleichen Population entstammen, bestückt. Hierfür wurde die Chondrozytensuspension jeweils vorsichtig in die Mitte der beiden Kammern pipettiert. Damit die Chondrozyten auf den Fibronektinschablonen gleichmäßig adhären, wurde die Kammer mit dem Glasdeckel verschlossen und für zehn Minuten nicht bewegt. Durch eine lichtmikroskopische Kontrolle wurde die gleichmäßige Adhäsion der Chondrozyten sichergestellt. Waren zwei oder mehr Chondrozyten auf den einzelnen Fibronektinschablonen gruppiert, wurde ein Teil der

Chondrozytensuspension abpipettiert und der Bestand auf den Mikroadhäsionsflächen erneut lichtmikroskopisch kontrolliert. Waren zu wenige der Fibronektinschablonen von Chondrozyten besetzt, wurden mehr Chondrozyten dazu pipettiert. Bei gleichmäßiger Bedeckung der Fibronektinschablonen wurde die Zellkammer mit dem Glasdeckel geschlossen und über Nacht bei +37 °C und 5 % CO₂ für 24 h im Inkubator gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Chondrozyten auf den Mikroadhäsionsflächen zunächst mit Calcein-AM und PI gefärbt (s. Kapitel 2.2.2) und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert (s. Kapitel 2.2.3). Anschließend wurden die Chondrozyten mit einem Spatel vom Glas-Chip gekratzt, in 350 µl RLT-Puffer gelöst und die Suspension ihrer Zellgeometrie „H-Shape“ und „O-Shape“ entsprechend in zwei Eppendorf-Cups überführt. Beim Ablösen der Chondrozyten wurde weder Trypsin noch Akkutase verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den isolierten, nicht manipulierten Chondrozytenproben zu gewährleisten. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -72 °C gelagert.

2.2.8 mRNA-Extraktion

Für die mRNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Dieses Set macht sich das Prinzip der Säulenextraktion zu Nutze. Dabei werden die Nukleinsäuren durch ionische Wechselwirkungen an eine negativ geladene Matrix, hier eine Kieselgel-Membran, gebunden. Die Membran wird mit verschiedenen Puffern (RW1- und RPE-Puffer) gewaschen. Hierdurch werden Verunreinigungen, wie Salze, Proteine und Kohlenhydrate, ausgespült. Dies erhöht zum einen die Reinheit der extrahierten mRNA und mindert zum anderen negative Störfaktoren beim späteren Umschreibprozess und der PCR-Analyse. Zusätzlich wird die Membran mit einer DNase-Lösung inkubiert, um vorhandene DNA zu verdauen und eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch DNA-Reste zu verhindern. Zum Schluss wird die mRNA mit RNase-freiem Wasser von der Kieselgel-Membran gelöst und die mRNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -72 °C gelagert (Padhye et al., 1997).

Material und Methoden

Da RNasen in jedem Gewebe vorhanden sind, wurde bei der mRNA-Extraktion darauf geachtet besonders sauber und mit Einmalhandschuhen zu arbeiten. Außerdem wurden die in der Probe vorhandenen RNasen frühzeitig denaturiert.

Bei der mRNA-Extraktion wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

Tabelle 6 Protokoll mRNA-Extraktion

1.	Auftauen der in RLT-Puffer gelösten Chondrozyten bei RT
2.	Fällen der Suspension durch Zufügen von 350 µl 70 %-igen Ethanol und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, anschließend wird das ganze Volumen auf ein Extraktionssäulchen überführt
3.	Säulchen 30 sek bei 10 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
4.	350 µl RW1-Puffer auf die Säulchenmembran pipettieren, 30 sek bei 10 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
5.	Die Membran mit 80 µl DNase-Lösung (bestehend aus 10 µl DNase-Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer) beschichten, 15-20 min bei RT inkubieren. (Dieser Schritt verhindert die Kontamination der Probe mit DNA)
6.	350 µl RW1-Puffer auf die Säulchenmembran pipettieren, 30 sek bei 10 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
7.	Membran mit 500 µl RWE-Puffer waschen, 30 sek bei 10 000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
8.	Membran erneut mit 500 µl RWE-Puffer waschen, 2 min bei 14 630 rpm zentrifugieren, Säulchen in ein neues Auffanggefäß umsetzen
9.	Für 30 sek bei 14 630 rpm zentrifugieren (max. mögliche Umdrehungszahl)
10.	Das Säulchen in ein sauberes, RNase freies Eppendorf-Cup überführen
11.	Membran mit 30 µl RNase freiem Wasser überschichten und 1 min bei RT inkubieren
12.	1 min bei 10 000 rpm zentrifugieren
13.	Säulchen verwerfen, Eppendorf-Cup aufheben: die extrahierte mRNA befindet sich nun im Überstand

Anschließend wurde die mRNA-Konzentration gemessen (s. Kapitel 2.2.9) und die mRNA in cDNA umgeschrieben (s. Kapitel 2.2.11) oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -72 °C gelagert (Qiagen, 2012).

2.2.9 mRNA-Messung mit dem NanoDrop ND-1000

Die mRNA-Konzentration der extrahierten Proben wurde mit dem Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 gemessen. Das Photometer arbeitet bereits mit sehr geringen Volumina. Für die Bestimmung der mRNA-Konzentration wurde 1 μl einer Probe auf das Ende des empfangenden fiberoptischen Kabels pipetiert, welches mit CCD-Sensoren (CCD= Charge-coupled-device; dt.: ladungsgekoppeltes Bauteil), also lichtempfindlichen Dioden, gekoppelt ist. Das zweite fiberoptische Kabel, welches als Lichtquelle eine gepulste Xenonlampe enthält, wird über einen absenkbaren Arm mit der Probe in Kontakt gebracht. Hierdurch überbrückt die Flüssigkeit die Lücke zwischen den zwei fiberoptischen Enden. Das Licht wird durch die Probe geschickt und anschließend mit Hilfe der CCD-Sensoren vom Spektrometer analysiert. Das Photometer wird über die zugehörige PC-Software gesteuert (ThermoScientific, 2008).

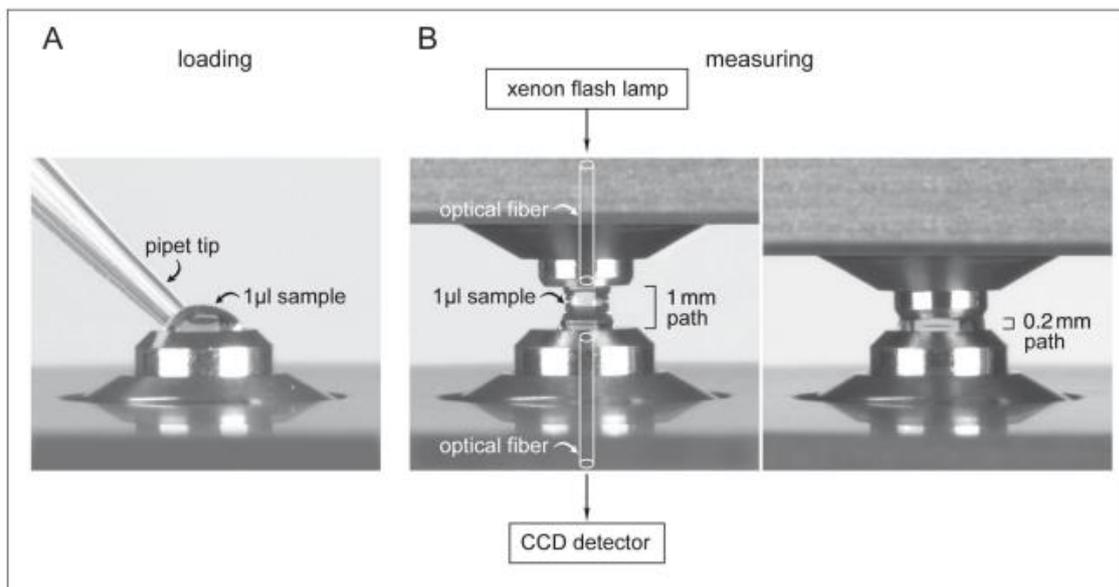


Abb. 22 NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer: Mikrovolumen-Proben-Retentions-System. Das System setzt sich aus zwei fiberoptischen Enden, die Quelle mit einer Xenonlampe, das empfangende Ende mit CCD-Sensoren, zusammen. Die 1 μl große Probe (A) bildet durch das Zusammenbringen der zwei fiberoptischen Enden eine Flüssigkeitssäule, deren Länge durch die Lücke zwischen den Oberflächen (1 mm bzw. 0,2 mm) bestimmt wird (B). Dies ermöglicht für die Detektion der Nukleinsäuren eine möglichst große dynamische Bandbreite (<http://nanodrop.com/Library/CPMB-1st.pdf>; Abruf: 13.09.2016).

Die mRNA-Konzentration wurde mit nachfolgendem Protokoll gemessen:

Tabelle 7 Protokoll Messung der mRNA-Konzentration (ThermoScientific, 2008)

1.	Reinigung der fiberoptischen Enden mit deionisiertem, RNase-freiem Wasser
2.	PC-Programm starten: Option „Nucleic Acid“ – „RNA-40“ wählen
3.	Initialisierung des Spektrometers: 1 μ l deionisiertes, RNase-freies Wasser auf die untere optische Oberfläche pipettieren, oberen Arm absenken und im PC-Programm über „Blank“ das Programm initialisieren
4.	Oberflächen abwischen
5.	1 μ l einer extrahierten mRNA-Probe auf die untere optische Oberfläche pipettieren, oberen Arm absenken; im PC-Programm die Probe benennen und über „Measure“ die Messung starten
6.	Für jede Probe die Schritte 4 und 5 zweimal durchführen
7.	Nach Abschluss der Messungen über „Print Report“ die Ergebnisse ausdrucken

Die gemessene mRNA-Konzentration basiert auf der Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm und wird in ng/ μ l angegeben. Jede Probe wurde zweimal gemessen und anschließend der Mittelwert der mRNA-Konzentration berechnet. In weiteren Analysen der mRNA-Konzentration wurde der Mittelwert verwendet.

Das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Ein Verhältnis um 2,0 entspricht „reiner“ RNA. Ist das Verhältnis deutlich kleiner als 2,0, kann dies als Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder anderen Störfaktoren, die stark bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, gedeutet werden (ThermoScientific, 2008). In dieser Arbeit lag der durchschnittliche Quotient 260/280 bei 1,8.

2.2.10 Anpassung der Methoden bei Verwendung von Mikroadhäsionsflächen

Bei der Verwendung von Mikroadhäsionsflächen (CYTOOchips) wurden deutlich weniger Chondrozyten als bei der Analyse aus 12 ± 4 Knorpeldiscs verwendet, da die Zahl der Chondrozyten durch die Anzahl der Fibronektinschablonen auf dem Glas-Chip beschränkt wurde. So setzte sich eine Chondrozytenprobe bei Verwendung der Mikroadhäsionsflächen aus etwa 7750 Chondrozyten zusammen (s. Kapitel 3.1.3), während eine Chondrozytenprobe, aus welcher nach der enzymatischen Isolation direkt die mRNA extrahiert wurde, aus mehr als 100 000 Chondrozyten (gewonnen aus 12 ± 4 Knorpeldiscs) bestand. Deswegen wurde für die Chondrozytenproben, die auf Grund der Verwendung von Mikroadhäsionsflächen in ihrer Zellanzahl limitiert waren, ein erweitertes Protokoll etabliert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Versuchsreihen zu erzielen. Hierfür wurde zum einen bei der mRNA-Extraktion die Ethanolmenge zur Fällung der Proben variiert (mit dem Ziel eine größere mRNA-Menge zu fällen), zum anderen wurde nach der mRNA-Extraktion die Konzentration des Endvolumens durch Volumenreduktion erhöht. Diese zwei Zwischenschritte wurden nur mit den Chondrozytenproben, die auf Mikroadhäsionsflächen aufgebracht wurden, durchgeführt.

Zum Vergleich der Ethanolmenge wurden insgesamt sechs Proben mit 350 μ l und sechs Proben mit 700 μ l 70 %-igen Ethanol gefällt. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 ersichtlich.

Material und Methoden

Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge wurden die extrahierten mRNA-Proben von 30 μl auf ein Endvolumen von 13,5 μl konzentriert. Hierbei wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

Tabelle 8 Protokoll für die Vakuumkonzentrierung der extrahierten mRNA

1.	Startvolumen: 30 μl extrahierte mRNA mRNA-Konzentration der extrahierten mRNA mit 1 μl der Probe im NanoDrop ND-1000 messen
2.	Den Deckel des Eppendorf-Cups mehrfach mit einer Kanüle einstechen
3.	Eppendorf-Cups gleichmäßig verteilt in die Vakuum-Zentrifuge stellen
4.	Zentrifugendeckel schließen - Rotationsmotor anstellen - Zentrifugenheizung anstellen - Vakuummotor anstellen - Vakuumventil öffnen
5.	10 min bei 1250 rpm zentrifugieren
6.	Vakuumventil schließen - erst, wenn Normaldruck herrscht, Rotationsmotor ausstellen - Zentrifugendeckel öffnen - Eppendorf-Cups entnehmen
7.	Volumen der Probe kontrollieren: - = 13,5 μl : Probe in neues Eppendorf-Cup (intakter Deckel) überführen - > 13,5 μl : für weitere 5 min zentrifugieren (s. Schritte 4-6) - < 13,5 μl : mit RNase-freiem Wasser auf 13,5 μl auffüllen
8.	mRNA-Konzentration mit 1 μl der Probe im NanoDrop ND-1000 messen

Für die Protokolletablierung wurden die durchschnittlich extrahierten mRNA-Konzentrationen von Proben, die mit 350 μl bzw. 700 μl Ethanol gefällt wurden, jeweils vor und nach der Vakuumkonzentrierung, also bei 30 μl bzw. 13,5 μl Gesamtvolumen, gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der durchschnittlich extrahierten mRNA-Konzentration der Chondrozyten aus Knorpeldiscs verglichen.

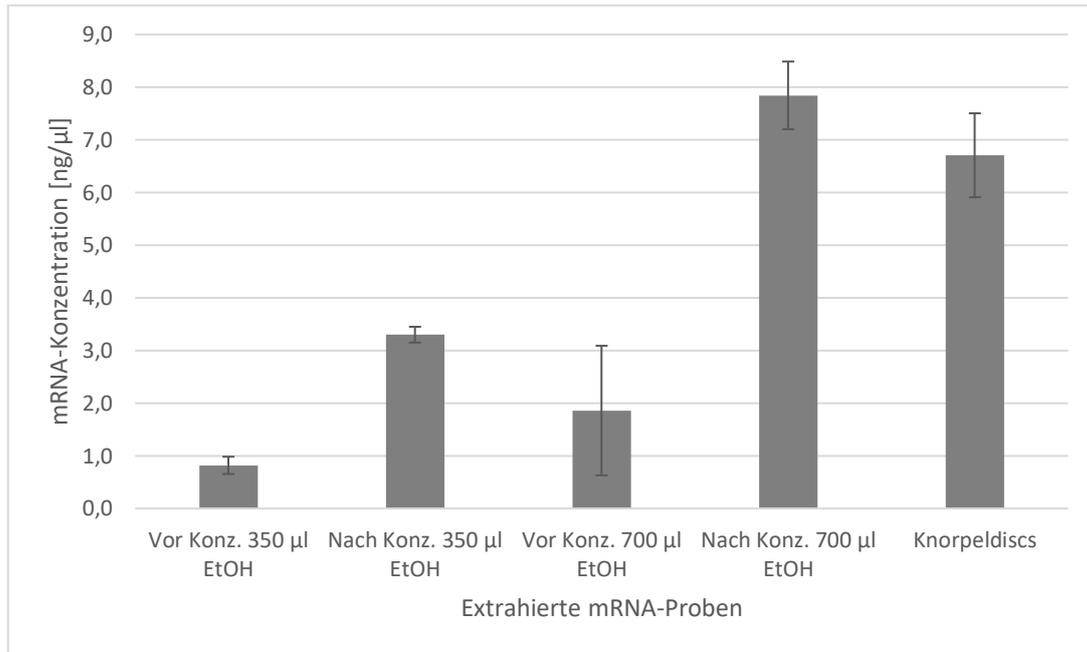


Abb. 23 Balkendiagramm: Vergleich der extrahierten mRNA-Konzentration verschiedener Versuchsansätze zur Protokolletablierung. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der verschiedenen Versuchsansätze. Die Knorpelproben wurden vor der Extraktion entweder mit 350 μl Ethanol (Vor Konz. 350 μl, Nach Konz. 350 μl, Knorpeldiscs), oder mit 700 μl Ethanol (Vor Konz. 700 μl, Nach Konz. 700 μl) gefällt. (Vor Konz. 350 μl: n= 6 Proben; Nach Konz. 350 μl: n= 6 Proben; Vor Konz. 700 μl: n= 6 Proben; Nach Konz. 700 μl: n= 6 Proben; Knorpeldiscs: n=97 Proben).

Im Balkendiagramm zeigt sich, dass die Chondrozytenproben, die mit 700 μl Ethanol gefällt und nach abgeschlossener mRNA-Extraktion auf 13,5 μl konzentriert wurden, durchschnittlich am ehesten der mRNA-Konzentration von Chondrozytenproben, die ohne diese Zwischenschritte verarbeitet wurden, entsprechen. Die durchschnittliche Differenz von 1,14 ng/μl extrahierter mRNA zwischen diesen zwei Gruppen kann vermutlich auf verschiedene Störfaktoren wie z. B. die verschiedenen großen Probengruppen (n(Nach Konz 700 μl) = 6 Proben, n(Knorpeldiscs) = 97 Proben) oder die Fehleranfälligkeit der Nano-Drop-Messung (Messvolumen = 1 μl) zurückgeführt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden alle CYTOOchip-Proben vor der weiteren Analyse mit 700 μl Ethanol gefällt und nach der mRNA-Extraktion auf ein Endvolumen von 13,5 μl konzentriert. Anschließend wurde die extrahierte und konzentrierte mRNA wie in den Kapiteln 2.2.11 und 2.2.12 beschrieben weiterverarbeitet und analysiert.

2.2.11 mRNA-Umschreibung in cDNA

Da die Analyse der mRNA-Expression durch eine PCR erfolgte, musste die extrahierte mRNA zunächst per Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden:

Bei dem Enzym Reverse Transkriptase handelt es sich um eine RNA- und DNA- abhängige DNA-Polymerase. Die Reverse Transkriptase besitzt zwei Aktivitäten: Zunächst synthetisiert sie als DNA-Polymerase anhand eines RNA-Einzelstranges einen komplementären, doppelsträngigen RNA-DNA-Hybridstrang. Anschließend wird der RNA-Strang von einer Untereinheit des Enzyms, der Nuklease „RNase H“, abgebaut. Zuletzt synthetisiert die DNA-abhängige DNA-Polymerase anhand des DNA-Einzelstrangs einen DNA-Doppelstrang.

Um an den RNA-Einzelstrang anknüpfen zu können, benötigt die Reverse Transkriptase einen Startpunkt mit einem freien 3'-OH-Ende. Dieser wird durch Primer gestellt, welche vor dem eigentlichen Umschreibeprozess an den RNA-Einzelstrang angelagert werden. Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die sich an komplementäre Bereiche des RNA-Strangs anlagern. Da die Gensequenz der Proben vorab nicht bekannt ist, werden für die Umschreibung zwei verschiedenen Primer verwendet: Ein „Random Hexamer“-Primer und ein „Oligo-dT“-Primer. Der „Random Hexamer“-Primer besteht aus zufälligen Sequenzen aus sechs Nukleotiden und lagert sich dementsprechend zufällig an komplementäre Nukleotidsequenzen der Einzelstrang-RNA an. Hierdurch entsteht ein Mix aus relativ kurzen cDNA-Strängen, die zusammen die gesamte RNA in einer Probe repräsentieren. Der „Oligo-dT“-Primer besteht aus einer 18 Desoxythymidin langen Sequenz und lagert sich komplementär an den Poly-Adenin-Schwanz der Einzelstrang-mRNA an, der nur bei mRNA vorhanden ist. Dadurch bieten „Oligo-dT“-Primer den Vorteil, dass sie explizit mRNA transkribieren und dass durch ihre Anbindung am 3'-Ende der mRNA alle Transkripte an etwa der gleichen Stelle beginnen. Als Nachteil ist jedoch zu beachten, dass das Enzym lange Transkripte nicht immer vollständig umschreiben kann, so dass teilweise nicht die vollständige mRNA repräsentiert wird. Daher wird in der

Praxis eine Kombination aus beiden oben aufgeführten Primern eingesetzt (Rassow et al., 2008, Clontech, 2010).

Die Umschreibung der extrahierten mRNA in cDNA erfolgte mit dem Advantage RT-for-PCR- Kit (Clontech).

Das Umschreiben läuft in folgenden Schritten ab:

1. Annealing: Der „Oligo-dT“-Primer und der „Random-Hexamer“-Primer lagern sich bei einer Temperatur von +72 °C an die RNA-Einzelstränge an. Nach dem Annealen muss die Temperatur rasch gesenkt werden, um ein Ablösen der Primer zu verhindern.

2. Umschreiben: Der Umschreibeprozess erfolgt bei +42 °C, da es sich hierbei um die optimale Arbeitstemperatur der Reversen Transkriptase handelt.

3. Denaturieren: Das kurzzeitige Erhitzen des Gemisches auf +90 °C dient zur Denaturierung und damit zur Zerstörung des Enzyms und stoppt somit den Umschreibeprozess.

Der Mastermix wurde für jede Probe wie folgt zusammen pipettiert:

- „Reactionbuffer“: 4 µl
- dNTP-Mix: 1 µl
- „Recombinant Inhibitor“: 0,5 µl
- „MMLV Reverse Transcriptase“: 1 µl

Es wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

Tabelle 9 Protokoll für die Umschreibung von mRNA in cDNA

1.	Überführen von 11,5 µl einer mRNA-Probe in einen sauberen Eppendorf-Cup
2.	Annealing: Zufügen von 1 µl „Oligo-dT“-Primer und 1 µl „Random-Hexamer“-Primer, im Thermocycler für 2 min bei +70 °C inkubieren, anschließend sofort auf Eis kühlen
3.	6,5 µl Mastermix zu dem mRNA-Primer-Gemisch pipettieren, gut durchmischen
4.	Für 60 min bei +42 °C im Thermocycler inkubieren
5.	Für 5 min bei +90 °C im Thermocycler inkubieren, anschließend auf Eis kühlen
6.	Reaktionsgemisch mit 20 µl RNase- freiem Wasser verdünnen

Die 1:1 Verdünnung der umgeschriebenen cDNA mit 20 µl RNase freiem Wasser ergibt ein größeres Probenvolumen für die qRT-PCR-Analyse (quantitative real time polymerase chain reaction).

Die cDNA wurde mittels qRT-PCR analysiert (s Kapitel 2.2.12). oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -72 °C gelagert.

2.2.12 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Quantitative real time polymerase chain reaction - qRT-PCR)

Um das mRNA-Expressionsprofil der Chondrozyten zu analysieren, wurde mit den extrahierten und umgeschriebenen Proben eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Diese bietet die Möglichkeit, die zu untersuchenden Gene gleichzeitig zu vervielfältigen und zu quantifizieren.

Für eine erfolgreiche PCR werden folgende Bestandteile benötigt: Die zu vervielfältigenden cDNA-Proben, welche als DNA-Matrizen dienen, eine hitzestabile DNA-Polymerase, Primer, die jeweils mit der Anfangssequenz des zu amplifizierenden Gens übereinstimmen, sowie genügend freie Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs).

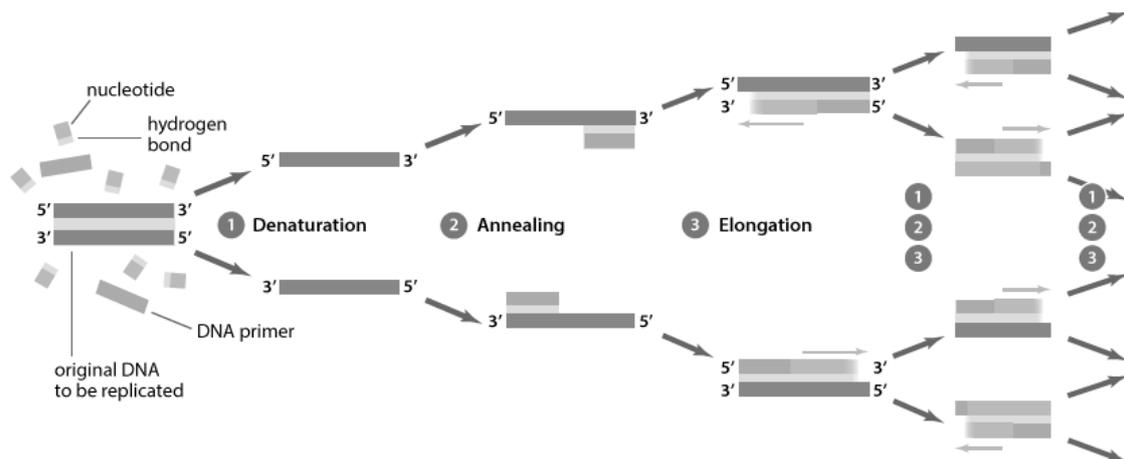


Abb. 24 Schematische Darstellung der PCR. Die PCR erfolgt in drei Schritten: 1. Denaturieren, 2. Annealing, 3. Elongation. Diese Teilschritte werden 40-mal zyklisch wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Amplifikaten erreicht ist. (https://www.abm-good.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php; Abruf: 09.10.2016).

Die PCR erfolgt in drei grundlegenden Schritten:

- 1. Denaturierung:** Zunächst werden die doppelsträngigen cDNA-Proben auf +94 - 96 °C erhitzt. Dieser Denaturierungsschritt bricht die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen auf, so dass zwei DNA-Einzelstränge entstehen. Dieser Schritt ist notwendig, da sich Primer nur an DNA-Einzelstränge anlagern können.
- 2. Annealing:** Die Reaktionstemperatur wird für 30 sek auf ca. +60 °C gesenkt. Bei dieser Temperatur lagern sich die spezifischen Primer an die cDNA-Einzelstränge an. Die genaue Temperatur des Anlagerns, genannt Annealen, ist abhängig von der Primersequenz. Um das vollständige Genprodukt zu erhalten, werden sowohl Primer, die sich an das 5'-Ende anlagern, genannt „forward“-Primer, als auch Primer, die sich an das 3'-Ende anlagern, genannt „backward“-Primer, verwendet. Die Primer bieten der DNA-Polymerase die benötigten 3'-OH Bindungsstelle, da die Synthese des komplementären Strangs nur in 5'-3'-Richtung erfolgen kann.

3. Elongation: Im letzten Schritt, der Elongation, wird der DNA-Einzelstrang beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers bei +72 °C durch vorab hinzugefügte freie Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zum DNA-Doppelstrang komplettiert. Dieser Schritt wird durch die DNA-Polymerase katalysiert. Damit die Vervielfältigung der cDNA-Proben zyklisch ohne Unterbrechungen ablaufen kann, wird eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) verwendet. Diese stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und trägt auf Grund ihrer Hitzestabilität in der Denaturierungsphase keine Funktionsschäden davon (Schochetman et al., 1988, Löffler and Petrides, 2013). Zusätzlich steigert die Hitzestabilität die Spezifität der PCR, da es bei Unterschreitung der Annealing-Temperatur zu unspezifischen Basenpaarbildung und damit zu ungewünschten Nebenprodukten kommen würde (Rassow et al., 2008).

Diese drei Schritte werden 40-mal zyklisch wiederholt, dabei nimmt die Anzahl der Amplifikate exponentiell zu (Roche, 2016).

Bei den zu untersuchenden Genen, auch Zielgens genannt, handelt es sich um die Genloci COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 der Kollagentypen I, II, III und VI. Die Bestimmung der quantitativen Ausprägung des Zielgens erfolgt immer im Verhältnis zu zwei Referenzgenen (MIQE-Guidelines (Bustin et al., 2009)). Hierdurch handelt es sich um eine relative Quantifizierung und es können keine absoluten Aussagen getroffen werden. Bei den Referenzen handelt es sich meistens um sogenannte „Housekeeping-Gene“, die konstant und dabei unabhängig von der Stoffwechsellage der Zelle und unabhängig von äußeren Faktoren, exprimiert werden. Da sich die relative Expressionshöhe aller Zielgene auf die gleichen Referenzgene mit konstanter Expression beziehen, können Unterschiede in der Expression von Zielgenen in verschiedenen Zellproben entdeckt und analysiert werden. Als erstes Referenzgen wurde RPL13A gewählt, da es ein sehr stabiles Housekeeping-Gen in Chondrozyten darstellt (Pombo-Suarez et al., 2008). Obwohl GAPDH im Vergleich zu RPL13A in Chondrozyten weniger konstant exprimiert wird, wurde es für diese Arbeit als zweites Referenzgen ausgewählt, da es in der bisherigen Literatur das klassische Housekeeping-Gen darstellt und somit einen Vergleich

der erhobenen quantitativen Expressionsdaten mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur ermöglicht.

Table 10 *Verwendete Primersequenzen für die qRT-PCR. A=Adenin, C=Cytosin, G= Guanin, T=Thymin. f= forward, r= backward. Alle Primersequenzen sind sondenbasiert und beziehen sich auf die „RealTime ready Assays“ der Firma Roche.*

Gen	Primersequenz (5' - 3')
GAPDH	f: CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC r: ACGACCAAATCCGTTGACT
RPL13A	f: CTGGACCGTCTCAAGGTGTT r: GCCCCAGATAGGCAAACCTT
COL1A2	f: TCTGGAGAGGCTGGTACTGC r: GAGCACCAAGAAGACCCTGA
COL2A1	f: CTGGTCCTCAAGGCAAAGTT r: GAGGTCCAGGACGACCATC
COL3A1	f: ACTGGAGCACGGGGTCTT r: TCCTGGTTTCCCACCTTTCAC
COL6A1	f: GAAGAGAAGGCCCGTTG r: CGGTAGCCTTTAGGTCCGATA

Bei der qRT-PCR werden die Proben zusätzlich mit Hybridisierungssonden versetzt, die für jede Gensequenz spezifisch sind, mit der DNA interkalieren und nach jedem Amplifizierungszyklus photometrisch gemessen werden. Die Sonden senden, sobald sie spezifisch gebunden haben, ein Fluoreszenzsignal aus. Da das Fluoreszenzsignal proportional zur vervielfältigten DNA-Menge des Zielgens ist und die cDNA-Menge innerhalb einer Probe abhängig von der ursprünglich extrahierten mRNA-Menge der Probe ist, lassen sich Rückschlüsse auf die relative mRNA-Expression des Zielgens zu den Referenzgenen und somit auch auf das relative Genexpressionsprofil der entsprechenden Chondrozyten ziehen (Roche, 2016, Heid et al., 1996, Arya et al., 2014).

Die Effizienzen für alle hier verwendeten Primer wurden dreimalig mit einer 1:10-Verdünnungsreihe getestet und daraus der Mittelwert bestimmt. Für die Auswertung der qRT-PCR-Daten wurde die Standardkurve ausgewählt, die dem Mittelwert am nächsten kam. Die Primereffizienzen wurden vorab von J.

Material und Methoden

Schröder und T. Uynuk-Ool ermittelt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11 Ermittelte Primereffizienzen. Die Effizienz wurde für jedes Referenz- und Zielgen dreimal bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert ermittelt und diejenige Standardkurve für die spätere quantitative Bestimmung verwendet, welche dem Mittelwert am nächsten kam. Die für die Auswertung verwendete Standardkurve ist jeweils fett gedruckt hervorgehoben. Die Effizienzen für die Primer von COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL6A1 und RPL13A wurden von J. Schröder und für GAPDH von T. Uynuk-Ool ermittelt.

Primer	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3	Mittelwert
COL1A2	1,997	1,874	1,928	1,933
COL2A1	2,011	1,870	1,873	1,918
COL3A1	1,986	1,871	1,948	1,935
COL6A1	1,933	1,976	1,846	1,918
RPL13A	1,957	2,010	1,842	1,936
GAPDH	1,940	2,010	1,981	1,977

Der Reaktionsmix für die qRT-PCR setzte sich mit insgesamt 18 µl pro Probe wie folgt zusammen:

- RNase-freies Wasser: 5,5 µl
- Mastermix (LightCycler 480 Probes Master): 10 µl
- Primer forward (3'-5'): 1 µl
- Primer backward (5'-3'): 1 µl
- TaqMan-Sonde: 0,5 µl

Sowohl die cDNA-Proben, als auch die Positiv- und Negativkontrollen wurden doppelbestimmt. Als Positivkontrolle diente eine cDNA-Probe mit der räumlichen Organisationsform „Strings“, die vor der PCR analog zu den zu untersuchenden Proben verarbeitet wurde. Die Positivkontrolle, auch Kalibrator genannt, wurde einmalig mit RNase-freiem Wasser (PCR-grade) im Verhältnis 1:40 verdünnt und im gesamten Versuchszeitraum nicht durch eine andere Probe ausgetauscht. Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser.

Für die PCR wurden spezielle 96-Well-Platten der Firma Roche verwendet. Nach zuvor erstelltem Pipettierschema wurden jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl

der entsprechenden cDNA-Probe in einen Well gegeben und der Inhalt durch auf- und abpipettieren gemischt. Dann wurde die 96-Wellplatte mit einer Folie luftdicht verschlossen und für 1 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die abschließende qRT-PCR und die Messung der quantitativen Zunahme der amplifizierten Gene lief im LightCycler 480 wie folgt ab:

Tabelle 12 Light Cycler 480-qRT-PCR-Programm. Für jeden Schritt bzw. Teilschritt (s. Amplifizierung) wurden jeweils Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen angegeben.

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Pre-Inkubation		+95 °C	10 min	1
Amplifizierung	Denaturierung	+95 °C	10 s	40
	Annealing	+60 °C	30 s	40
	Elongation	+72 °C	1 s	40
Abkühlen		+40 °C	30 s	1

2.2.13 Auswertung der qRT-PCR-Daten

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der Software LightCycler 480® SW 1.5.0. Für jeden qRT-PCR-Run wurde eine eigene Datei angelegt. Im „Sample Editor“ wurde zunächst jedem Well die entsprechende Probe, bzw. Positiv-/Negativkontrolle mit den zugehörigen Eigenschaften (Probenname, Genname, Referenz/Target, Kontrolle/Probe) zugeordnet. Für die Doppelbestimmung wurden identische Proben mit der Funktion „Make Replicates“ verknüpft. Anschließend wurde für jedes Gen, das sich auf der aktuellen Platte befindet, ein „Subset“ angelegt, welches alle Proben eines Gens inkl. Positiv- und Negativkontrolle enthielt.

Nach Abschluss der PCR wurde im Analysemodus die Genexpressionshöhe für jedes Subset mit Hilfe der „Advanced Relative Quantification“ mit folgenden Grundeinstellungen berechnet:

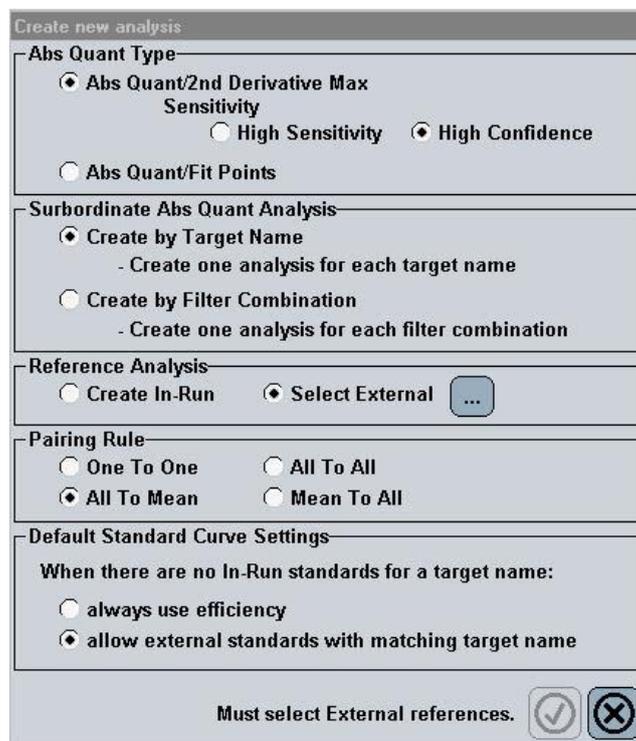


Abb. 25 Programmeinstellung „Advanced Relative Quantification“ zur Auswertung der gemessenen qRT-PCR-Daten. Grundeinstellung im Analysemodus „Advanced Relative Quantification“ des Programms Light Cycler® 480 SW 1.5.1., dient zur Berechnung der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene.

Als externe Referenz („Reference Analysis: Select External“) wurde die Platte mit den Referenzgenen der identischen Proben gewählt. Für die Effizienzen wurden die Standardkurven aus Tabelle 11 als externe Standards verknüpft.

In folgender Abbildung ist eine exemplarische Analyse eines vollständigen PCR-Runs dargestellt:

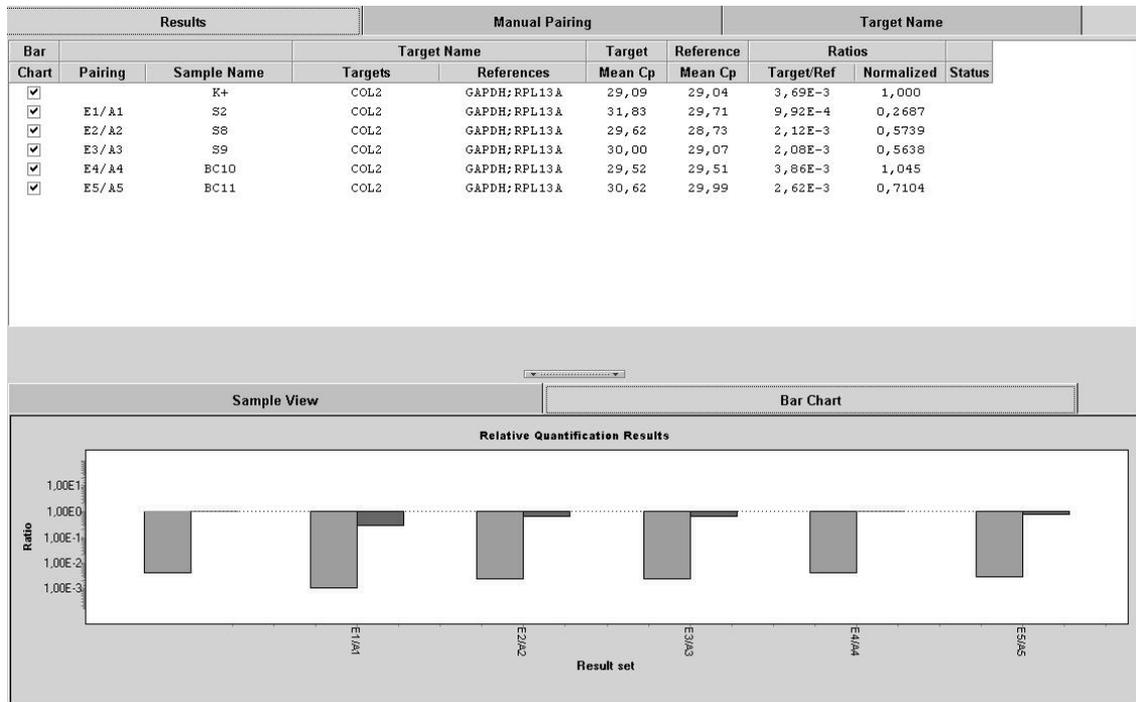


Abb. 26 Exemplarische Auswertung erhobener qRT-PCR-Expressionsdaten mittels des Light Cycler 480. Das Bild zeigt eine abgeschlossene Auswertung relativer mRNA-Expressions-Rohdaten bei der Verwendung des Programms Light Cycler® 480 SW 1.5.1. mit der Analyseform: „Advanced Relative Quantification“.

Die Rohdaten target/ref wurden im Verhältnis zur Positivkontrolle normalisiert (s. letzte Spalte der Abb. 26: „Normalized“), um die statistische Auswertung der mRNA-Expressionsprofile über mehrere PCR-Runs hinweg zu ermöglichen. Als Paarungsregel wurde „All-to-mean“ gewählt, d. h., dass jedes Zielgen mit dem arithmetischen Mittelwert der beiden Referenzgene gepaart wird.

In der statistischen Auswertung wurde ausschließlich mit den normalisierten Daten weitergearbeitet.

2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 11.0 verwendet. Die zu vergleichenden Gruppen wurden auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Dabei wurde ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant eingestuft. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand eines Kolmogorov-Tests untersucht. Beim Vergleich der Datensätze zweier unabhängiger Gruppen wurde bei normalverteilten Daten ein t-Test durchgeführt, bei nicht normalverteilten Daten kam der Mann-Whitney Rank Sum Test zum Tragen. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde zunächst eine ANOVA on Ranks-Test (Kruskal-Wallis) durchgeführt. Bei signifikanten Unterschieden wurde anschließend ein Post-hoc Dunn-Test angewendet. Statistische Signifikanzen wurden in den Tabellen hellgrau kodiert.

Dargestellte Balkendiagramme setzten sich aus den arithmetischen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardfehlern als Fehlerindikatoren zusammen. Sofern statistische Signifikanzen vorhanden waren, wurden die zusammenhängenden Gruppen durch eine mit Sternchen (*) gekennzeichnete Linie verbunden.

Dargestellte Boxplots setzten sich aus dem Median, der 25. und der 75. Perzentile, sowie einem Fehlerbalken zwischen der 10. und 90. Perzentile zusammen. Einzelne Ausreiser wurden nicht dargestellt.

Das Signifikanzniveau möglicher Korrelationen zwischen den relativen Kollagen mRNA-Expressionsprofilen über alle räumlichen Organisationsformen hinweg wurde mit der Pearson Produkt Moment Korrelation getestet.

Das Signifikanzniveau möglicher Korrelationen zwischen den relativen Kollagen mRNA-Expressionsprofilen und den verschiedenen räumlichen Organisationsformen wurde mit der Spearman-Rank-Order-Korrelation getestet. Hierfür war es notwendig die räumlichen Organisationsformen wie folgt zu kodieren: „Strings“= 1, „Doublestrings“= 2, „Small Clusters“= 3, „Big Clusters“= 4 und „Diffus“= 5.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse und Kontrolle der Zellgeometrie superfizieller Kniegelenkschondrozyten

Ziel dieses Kapitels war es herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Zellgeometrie der einzelnen superfiziellen Chondrozyten und der übergeordneten, superfiziellen räumlichen Organisationsform („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) der entsprechenden Chondrozyten besteht und ob diese Zellgeometrien durch externe Steuerung reproduzierbar sind. Hierfür wurde die Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten sowohl in vivo im Gewebe als auch bei enzymatisch isolierten Verhältnissen anhand verschiedener Shape Deskriptoren (Aspect Ratio (AR), Roundness (Round), Circularity (Circ) und Solidity (Sol)) ausgemessen. Das gewonnene Wissen über die Zellgeometrie der superfiziellen Chondrozyten innerhalb verschiedener Organisationsformen wurde anschließend dafür verwendet, die passenden Mikroadhäsionsflächen für die Kontrolle der Zellgeometrie auszuwählen. Ziel war es, die Zellgeometrie und hierdurch das phänotypische Genexpressionsprofil isolierter, dedifferenzierter Chondrozyten durch das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen kontrolliert zu steuern und hierdurch den Phänotyp gesunder bzw. kranker Chondrozyten in vitro nachzuahmen.

Die folgenden Abbildungen zeigen Bildausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von Calcein-AM gefärbten Knorpeldiscs aus der Vogelperspektive, also mit Blick auf die horizontale Gelenkfläche. Alle superfiziellen räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) wurden im Folgenden zweimalig abgebildet: Der linke Bildausschnitt stellt die unbearbeitete Aufnahme dar, der rechte Bildausschnitt zeigt die Aufnahme nach Analyse der Zellgeometrie einzelner Chondrozyten mit der Software „ImageJ“.

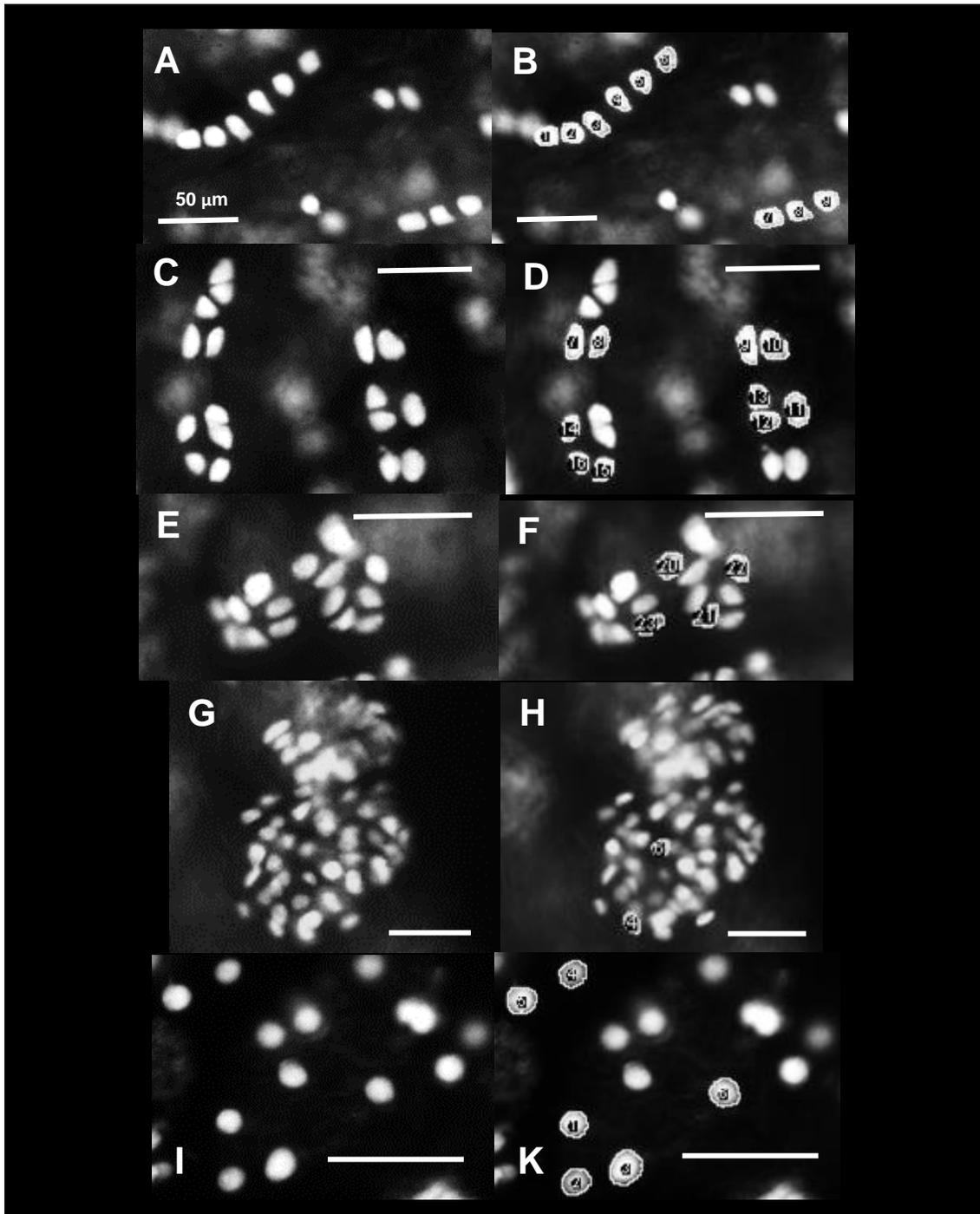


Abb. 27 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen. In der linken Spalte sind jeweils die unbearbeiteten Aufnahmen der superfiziellen Chondrozyten dargestellt. In der rechten Spalte sind die gleichen Bildausschnitte zu sehen, hier jedoch mit einzelnen, hervorgehobenen Chondrozyten, deren Zellgeometrie mit dem ImageJ-Arbeitsstool „Cell Magic Wand Tool“ markiert und anschließend analysiert wurden. Calcein-AM-Färbung, 10 x-Objektiv, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop, Blick „von oben“ auf die Gelenkfläche. Der weiße Balken in den Bildern entspricht 50 µm (A+B: „Strings“, C+D: „Doublestrings“, E+F: „Small Clusters“, G+H: „Big Clusters“, I+K: „Diffus“).

3.1.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten im humanen hyalinen Kniegelenksknorpel

Insgesamt wurden 4194 Chondrozyten aus 346 fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen analysiert. Die genaue Verteilung über alle räumlichen Organisationsformen hinweg ist im Anhang in Tabelle 31 ersichtlich.

Im Folgenden wurden die Chondrozyten der einzelnen räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und „Diffus“ in Bezug auf verschiedene Ausprägungen ihrer Zellgeometrie miteinander verglichen. Als Messparameter wurden hierfür die Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity verwendet.

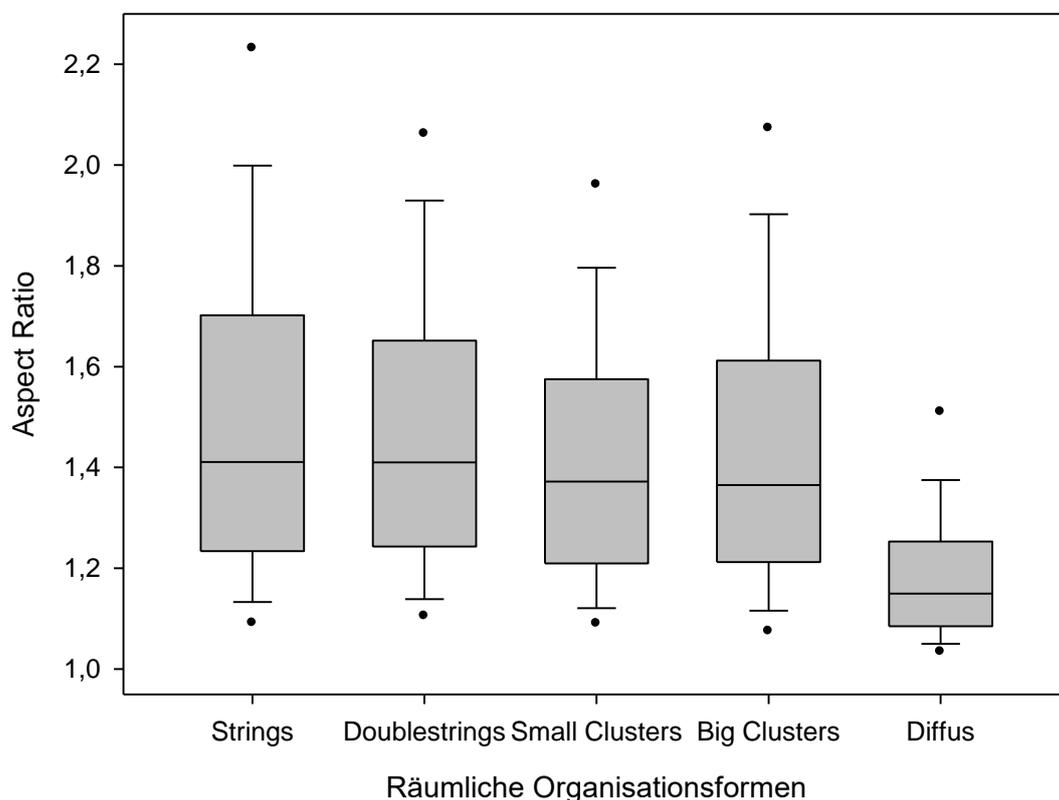


Abb. 28 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Aspect Ratio“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenksknorpel in verschiedenen räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Doublestrings“: n= 728 Chondrozyten, „Small Clusters“: n= 549 Chondrozyten, „Big Clusters“: n= 597 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Ergebnisse

Der Shape Deskriptor Aspect Ratio (AR) der analysierten Chondrozyten blieb zwischen „Strings“ und „Doublestrings“ statistisch unverändert, nahm aber von „Strings“ vs. „Small Clusters“, „Big Clusters“ und den diffus organisierten Chondrozyten signifikant ab. Zusätzlich nahm der AR jeweils von den „Doublestrings“, „Small Clusters“ und „Big Clusters“ vs. den diffus organisierten Chondrozyten signifikant ab (s. Tabelle 13). Diese Abnahme ging mit einem signifikant negativen Korrelationskoeffizienten einher (s. Tabelle 14).

Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Strings“ hatten mit einem durchschnittlichen AR von $1,508 \pm 0,01$ die am meist elliptisch geformte Zellgeometrie, während Chondrozyten in der diffus organisierten räumlichen Anordnung mit einem durchschnittlichen AR von $1,195 \pm 0,005$ am kreisförmigsten waren (s. Tabelle 32). Somit wurde erarbeitet, dass Chondrozyten vor dem Verlust der geometrisch-charakteristischen Zellgeometrie, hier durch „Strings“ repräsentiert, eine elliptische Zellgeometrie und somit den höchsten durchschnittlichen Wert für den AR aufwiesen, während Chondrozyten mit dem größten Verlust ihrer geometrisch-charakteristischen Zellgeometrie, hier repräsentiert durch diffus organisierte Chondrozyten, eine rundliche Zellgeometrie und somit den niedrigsten durchschnittlichen Wert für den AR aufwiesen.

Der Shape Deskriptor Roundness (Round) der analysierten, superfiziellen Chondrozyten blieb zwischen „Strings“ und „Doublestrings“ statistisch unverändert, nahm aber von „Strings“ vs. „Small Clusters“, „Big Clusters“ und den diffus organisierten Chondrozyten signifikant zu. Ebenso nahm die Round jeweils signifikant von „Doublestrings“, „Small Clusters“ und „Big Clusters“ vs. der diffus organisierten räumlichen Anordnung zu (s. Tabelle 13). Diese Zunahme ging mit einem signifikant positiven Korrelationskoeffizienten einher (s. Tabelle 14).

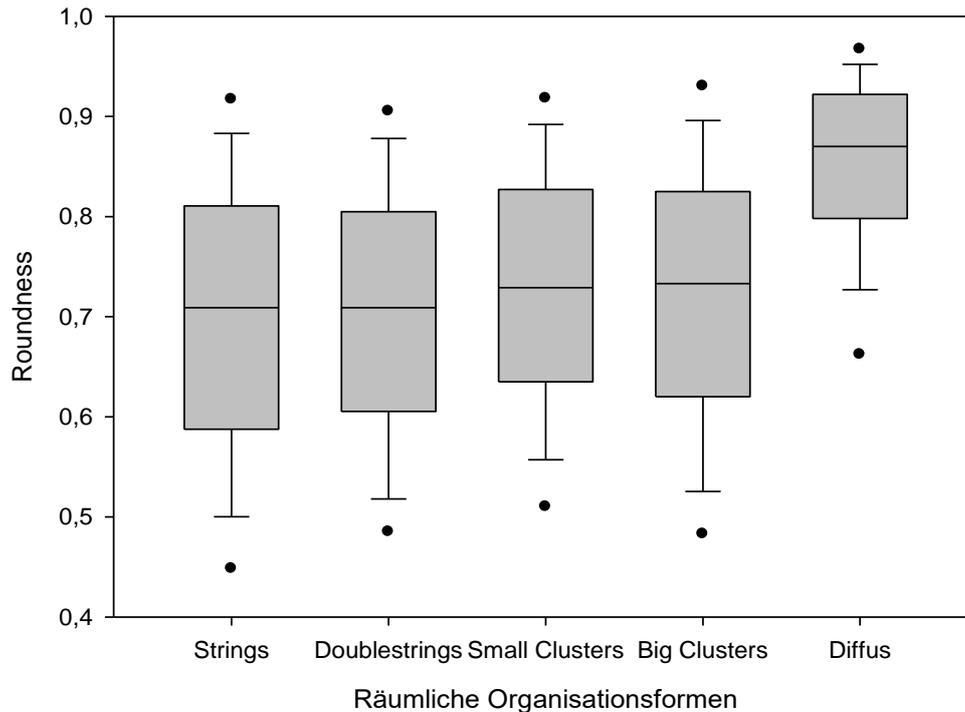


Abb. 29 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Roundness“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenksknorpel in verschiedenen superfiziell räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Doublestrings“: n= 728 Chondrozyten, „Small Clusters“: n= 549 Chondrozyten, „Big Clusters“: n= 597 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Strings“ hatten mit einer durchschnittlichen Round von $0,697 \pm 0,004$ die am meiste elliptisch geformten Zellgeometrie, während Chondrozyten in der diffus organisierten räumlichen Anordnung mit einer durchschnittlichen Round von $0,850 \pm 0,003$ am kreisförmigsten waren (s. Tabelle 32).

Zusammenfassend wurde erarbeitet, dass Chondrozyten vor dem Verlust der geometrisch-charakteristischen Zellgeometrie, hier durch „Strings“ repräsentiert, eine elliptische Zellgeometrie und somit den niedrigsten durchschnittlichen Wert für die Round aufwiesen, während Chondrozyten mit dem größten Verlust ihrer geometrisch-charakteristischen Zellgeometrie, hier repräsentiert durch diffus organisierte Chondrozyten, eine rundliche Zellgeometrie und somit mit dem höchsten durchschnittlichen Wert für die Roundness einhergingen.

Ergebnisse

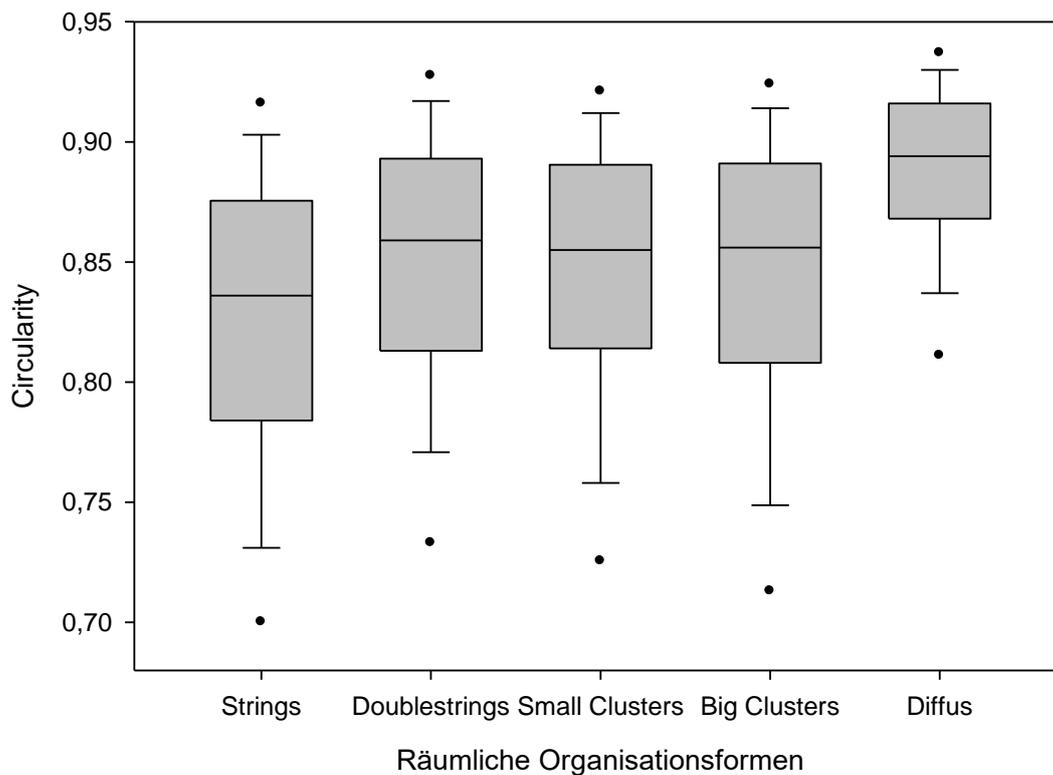


Abb. 30 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Circularity“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenksknorpel in verschiedenen superfiziell räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Doublestrings“: n= 728 Chondrozyten, „Small Clusters“: n= 549 Chondrozyten, „Big Clusters“: n= 597 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Bei den Shape Deskriptoren Circularity (Circ) und Solidity (Sol), welche beide die Oberflächenbeschaffenheit der Chondrozyten beschreiben, zeigten sich ähnliche signifikante Veränderungen. So nahm sowohl die Circularity als auch die Solidity der analysierten Chondrozyten von „Strings“ vs. „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und den diffus organisierten Chondrozyten signifikant zu. Zeitgleich nahm die Circ und die Sol jeweils von „Doublestrings“, „Small Clusters“ und „Big Clusters“ vs. der diffus organisierten räumlichen Anordnung signifikant zu (s. Tabelle 13). Diese Zunahme ging mit einem signifikant positiven Korrelationskoeffizienten einher (s. Tabelle 14).

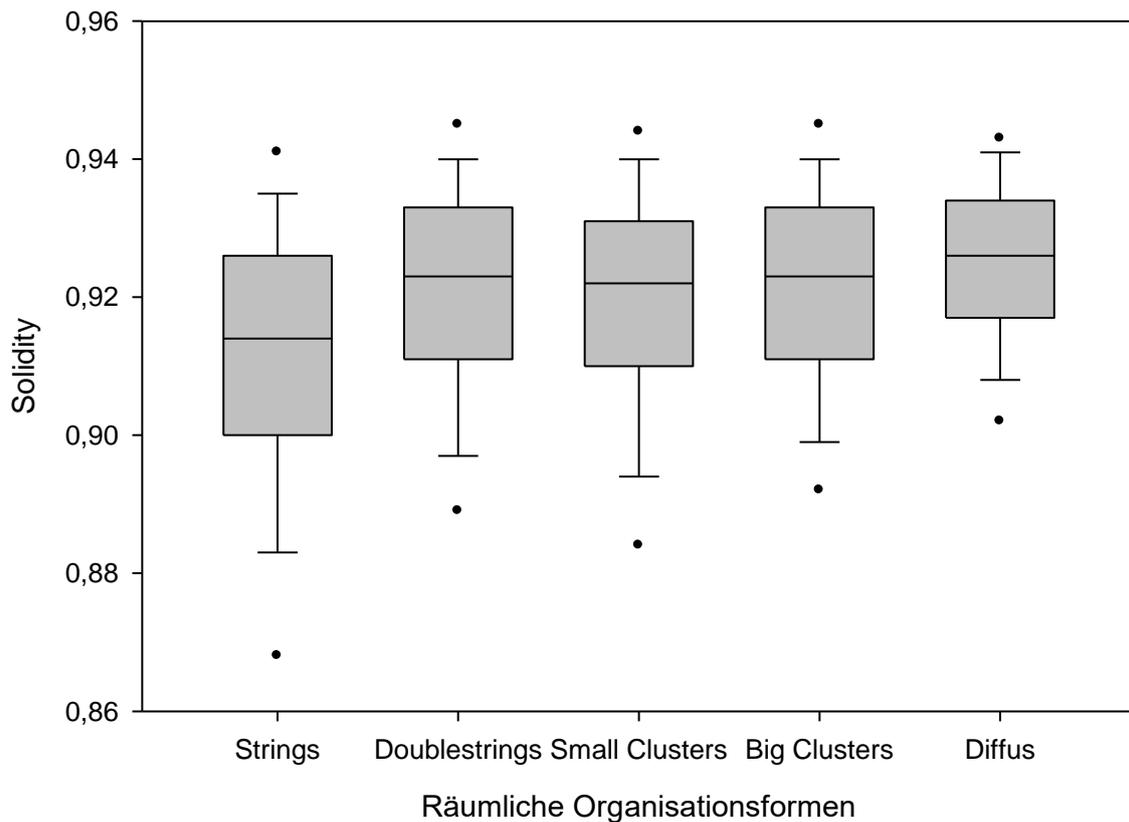


Abb. 31 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors „Solidity“ von superfiziellen Chondrozyten im hyalinen Kniegelenksknorpel in verschiedenen superfiziell räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Doublestrings“: n= 728 Chondrozyten, „Small Clusters“: n= 549 Chondrozyten, „Big Clusters“: n= 597 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Strings“ hatten mit der durchschnittlich geringsten Circ von $0,824 \pm 0,002$ und Sol von $0,911 \pm 0,001$ die größte Anzahl an Membranprotrusionen, während die diffus organisierten Chondrozyten mit der durchschnittlich größten Circ von $0,888 \pm 0,001$ und Sol von $0,925 \pm 0,0004$ die geringste Anzahl an Membranprotrusionen und somit die gleichmäßigste Membran aufwiesen (s. Tabelle 32). Diese Ergebnisse ließen den Rückschluss zu, dass Chondrozyten mit zunehmendem Verlust ihrer räumlichen Organisation geometrisch-morphologische Charakteristika - die mit der Präsenz von Membranprotrusionen einhergehen - verlieren.

Tabelle 13 Statistischer Vergleich von Chondrozyten verschiedener superfiziell räumlicher Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) in Bezug auf die Ausprägung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Test (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde. („Strings“: $n = 1481$ Chondrozyten, „Doublestrings“: $n = 728$ Chondrozyten, „Small Clusters“: $n = 549$ Chondrozyten, „Big Clusters“: $n = 597$ Chondrozyten, „Diffus“: $n = 839$ Chondrozyten).

		„Double-strings“	„Small Clusters“	„Big Clusters“	„Diffus“
Aspect Ratio	„Strings“		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Double-strings“				$p < 0,001$
	„Small Clusters“				$p < 0,001$
	„Big Clusters“				$p < 0,001$
Roundness	„Strings“		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Double-strings“				$p < 0,001$
	„Small Clusters“				$p < 0,001$
	„Big Clusters“				$p < 0,001$
Circularity	„Strings“	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Double-strings“				$p < 0,001$
	„Small Clusters“				$p < 0,001$
	„Big Clusters“				$p < 0,001$
Solidity	„Strings“	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Double-strings“				$p < 0,001$
	„Small Clusters“				$p < 0,001$
	„Big Clusters“				$p < 0,001$

Zusammengefasst waren in allen vier Parametern (AR, Round, Circ, Sol) die niedrigsten bzw. höchsten Werte aller Organisationsformen in Chondrozyten der „Strings“-Formation oder in diffus angeordneten Chondrozyten zu finden. Diese Veränderungen aller Shape Deskriptoren mit zunehmendem Ordnungsverlust gingen mit entsprechenden signifikanten Korrelationen einher (s. Tabelle 14). Insgesamt wiesen Chondrozyten in der „Strings“-Formation eine elliptische Zellgeometrie mit Charakteristika typisch für viele Membranprotrusionen und somit den höchsten Aspect Ratio, die niedrigste Roundness, die niedrigste Circularity und die niedrigste Solidity aller Organisationsformen auf. „Diffus“ organisierte Chondrozyten waren in allen Parametern signifikant anders und wiesen eine rundliche Zellgeometrie mit Charakteristika typisch für wenige Membranprotrusionen und somit den niedrigsten Aspect Ratio, die höchste Roundness, die höchste Circularity und die höchste Solidity aller Organisationsformen auf.

Zusätzlich zu diesen signifikanten Veränderungen korrelierten alle Shape Deskriptoren signifikant mit der räumlichen Organisation der Chondrozyten (s. Tabelle 14).

Tabelle 14 Korrelation der Ausprägung der Shape Deskriptoren (AR, Round, Circ, Sol) mit den aufsteigenden superfiziell räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte wurden anhand des Spearman-Rank-Order-Tests ermittelt. Für die Spearman-Korrelation war es notwendig, die räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten mit absoluten Zahlen zu kodieren („Strings“= 1; „Doublestrings“= 2, „Small Clusters“= 3, „Big Clusters“= 4, „Diffus“= 5). Ein positiver Korrelationskoeffizient weist auf einen Anstieg in der Ausprägung des jeweiligen Shape Deskriptors in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen von „Strings“ bis zur diffus organisierten Verteilung hin. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben.

Räumliche Organisationsform („Strings“= 1, „Doublestrings“= 2, „Small Clusters“= 3, „Big Clusters“= 4, „Diffus“=5) vs.:		Korrelationskoeffizient K und Signifikanzwert p
Aspect Ratio	K	-0,344
	p	<0,001
Roundness	K	0,344
	p	<0,001
Circularity	K	0,335
	p	<0,001
Solidity	K	0,257
	p	<0,001

Ergebnisse

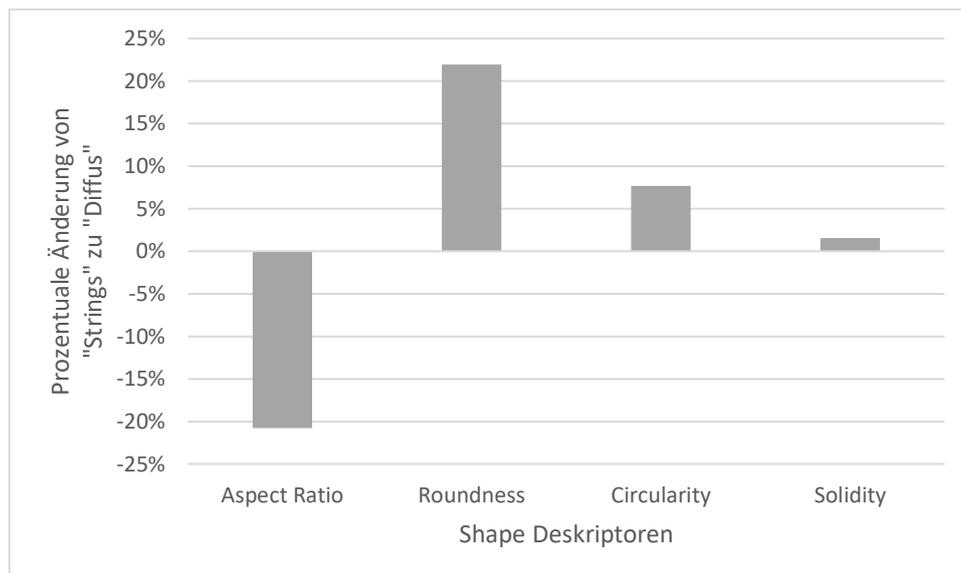


Abb. 32 Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „Strings“-Chondrozyten zu diffus organisierte Chondrozyten. Für die Berechnung der prozentualen Änderung wurden die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte verwendet.

Betrachtete man die räumlichen Organisationsformen als fortlaufenden Prozess im Zuge der OA, wie es von Felka und Rolauffs gezeigt wurde, entsprachen die Chondrozyten der „Strings“-Formation dem gesündesten Anfangsstadium und die Chondrozyten mit einer diffus organisierten Anordnung dem Endstadium der arthrotischen Erkrankung (Felka et al., 2016). Im Krankheitsverlauf änderten die Chondrozyten ihre zellmorphologischen Charakteristika in Bezug auf die Shape Deskriptoren von „Strings“ zu „Diffus“ um bis zu 22%. So hatten diffus organisierte Chondrozyten im Vergleich zu „Strings“-Chondrozyten durchschnittlich einen 20,7% kleineren AR, während die Roundness 22%, die Circularity 7,7% und die Solidity 1,6% zunahmen (s. Abb. 32 und Tabelle 15).

Tabelle 15 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren von Chondrozyten in der „Strings“-Formation zu diffus organisierten-Chondrozyten. Für die Berechnung der prozentualen Änderung wurden die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte verwendet.

Shape Deskriptoren	Prozentuale Änderung von „Strings“ zu „Diffus“
Aspect Ratio	-20,7 %
Roundness	+22 %
Circularity	+7,7 %
Solidity	+1,6 %

3.1.2 Verlust der Zellmorphologie nach enzymatischer Chondrozyten-Isolation aus humanen hyalinen Kniegelenksknorpel

In Kapitel 3.1.1 wurde die Zellgeometrie humaner Chondrozyten in vivo, im Gewebe, analysiert. Um einen Gesamtüberblick über das Verhalten von Chondrozyten unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die Shape Deskriptoren von superfiziellen, isolierten Chondrozyten aus drei verschiedenen Herkunftsquellen (reine „Strings“-Probe (= „Isol. aus „Strings““), reine diffus organisierte Probe (= „Isol. aus „Diffus““), makroskopisch intakte- nicht näher klassifizierte, gemischte Probe (= „Isol. aus „Gemisch““) ermittelt. Anschließend wurden diese Ergebnisse sowohl mit den zellgeometrischen Maßen von superfiziellen Chondrozyten in der „Strings“-Formation als auch mit den zellgeometrischen Maßen von diffus organisierten superfiziellen Chondrozyten im Gewebe aus Kapitel 3.1.1 verglichen. Hierdurch ergibt das Kapitel 3.1 eine vollständige Übersicht über das Aussehen der Chondrozyten im Gewebe (3.1.1), im enzymatisch isolierten Zustand (3.1.2) und nach dem Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen (3.1.3).

Im Folgenden wurden die enzymatisch isolierten, superfiziellen Chondrozyten anhand der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity analysiert:

Ergebnisse

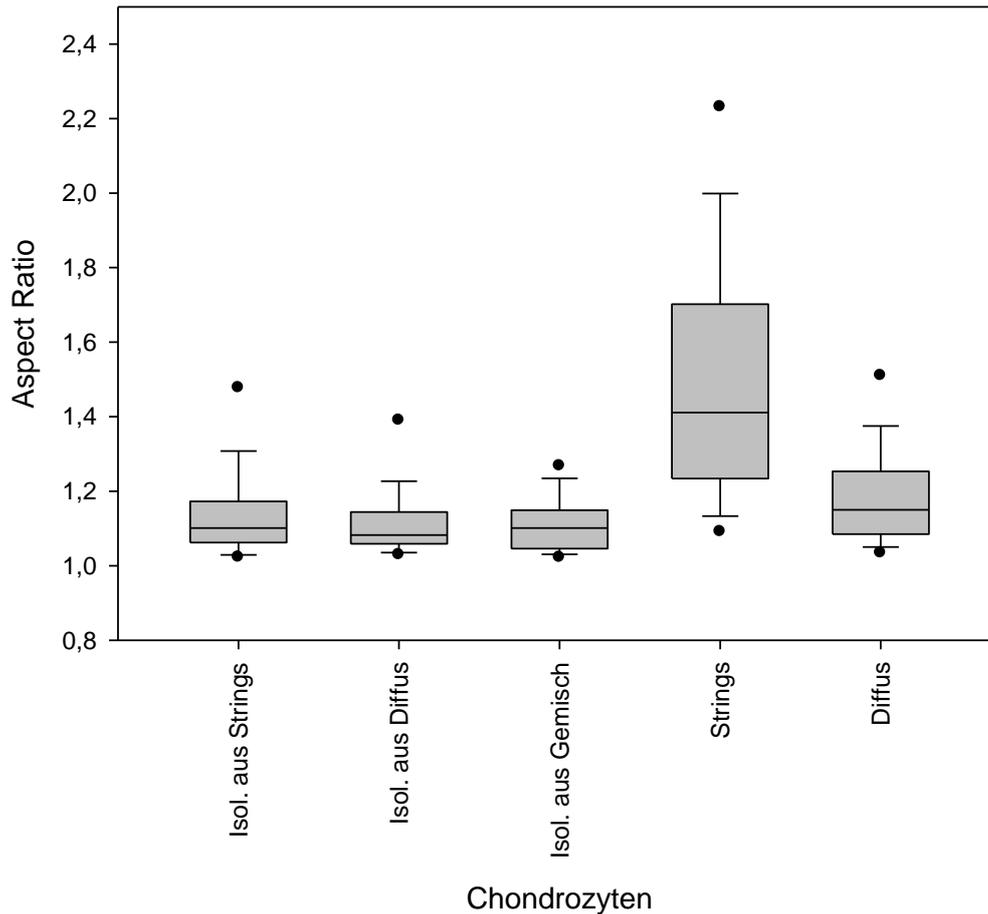


Abb. 33 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Aspect Ratio von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, Isol. aus „Gemisch“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. (Isoliert aus „Strings“: n= 110 Chondrozyten, Isoliert aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: n= 135 Chondrozyten, „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Der Shape Deskriptor Aspect Ratio blieb zwischen den drei Isolationsansätze „Isoliert aus „Strings““, „Isoliert aus „Diffus““ und „Isoliert aus Gemisch““ statistisch unverändert. Alle drei Isolationsansätze unterschieden sich jedoch sowohl signifikant von den superfiziellen Chondrozyten der räumlichen Organisationsform „Strings“ als auch von den superfiziellen diffus organisierten Chondrozyten (s. Tabelle 16).

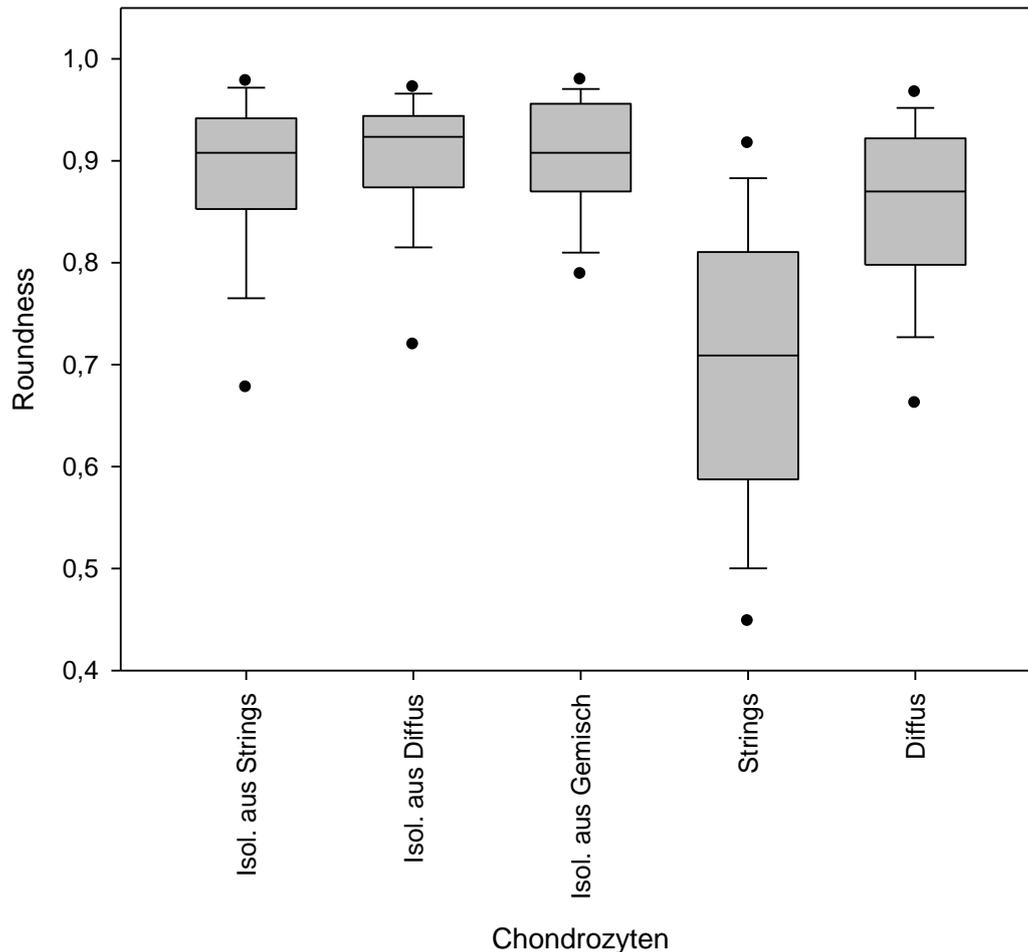


Abb. 34 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Roundness von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, Isol. aus „Gemischt“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. (Isoliert aus „Strings“: n= 110 Chondrozyten, Isoliert aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: n= 135 Chondrozyten, „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Der Shape Deskriptor Roundness blieb zwischen den drei Isolationsansätze „Isoliert aus „Strings““, „Isoliert aus „Diffus““ und „Isoliert aus Gemischt“ statistisch unverändert. Alle drei Isolationsansätze unterschieden sich jedoch sowohl signifikant von den superfiziellen Chondrozyten der räumlichen Organisationsform „Strings“, als auch von den superfiziellen, diffus organisierten Chondrozyten (s. Tabelle 16).

Ergebnisse

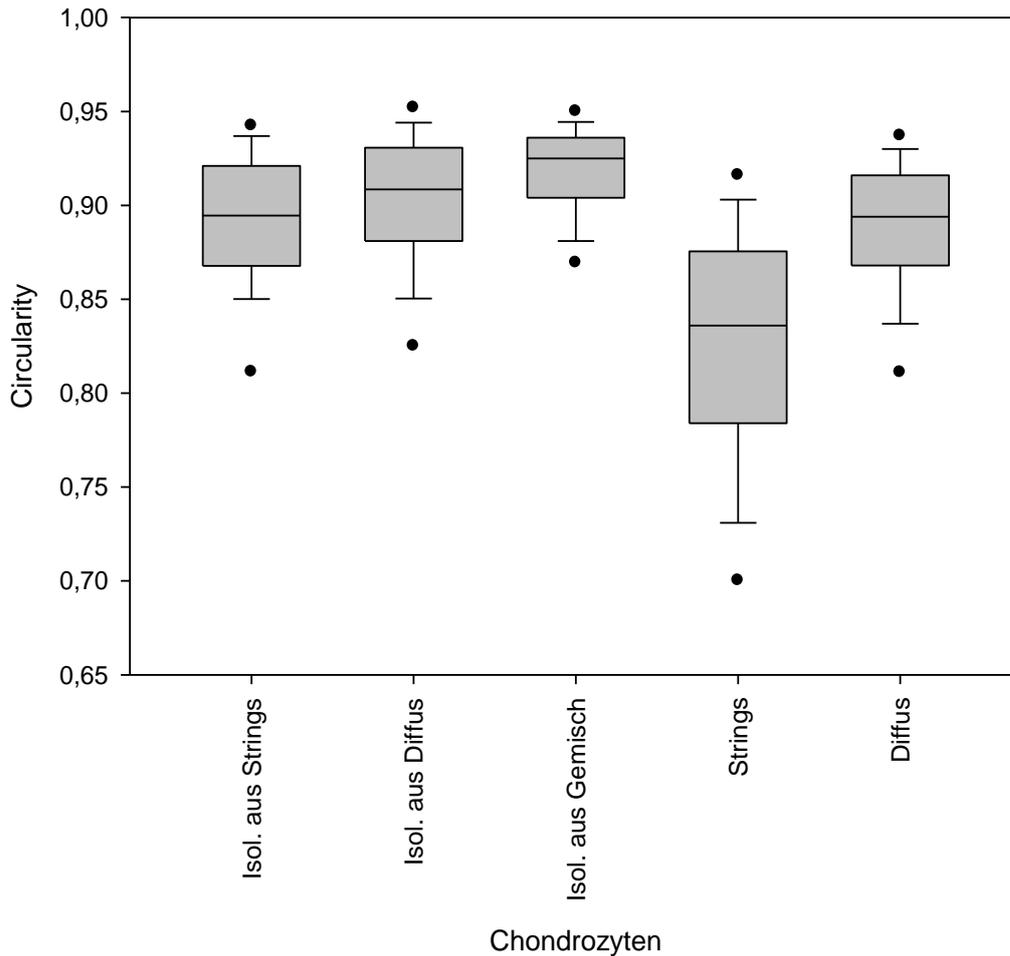


Abb. 35 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Circularity von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, Isol. aus „Gemisch“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. (Isoliert aus „Strings“: n= 110 Chondrozyten, Isoliert aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: n= 135 Chondrozyten, „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

In Bezug auf den Shape Deskriptor Circularity, welcher die Anzahl von Membranprotrusionen beschreibt, zeigte sich innerhalb der isolierten Proben, dass sowohl die isolierten Chondrozyten der reinen „Strings“-Probe als auch die isolierten Chondrozyten aus einer reinen diffusen Probe zu einer nicht-klassifizierten Probe (= „Isol. aus Gemisch“) signifikant unterschiedlich waren. Zeitgleich unterschieden sich die isolierten Chondrozyten aus reinen „Strings“- und den isolierten Chondrozyten aus reinen diffus organisierten Proben bzgl. der Circularity statistisch nicht voneinander. Erfolgte der Vergleich jedoch zwi-

schen enzymatisch isolierten Chondrozyten (in vitro) und Chondrozyten im Gewebe (in vivo), waren alle Vergleiche, außer die isolierten Chondrozyten der „Strings“-Proben vs. „diffusen“ Chondrozyten im Gewebe, signifikant unterschiedlich (s. Tabelle 16).

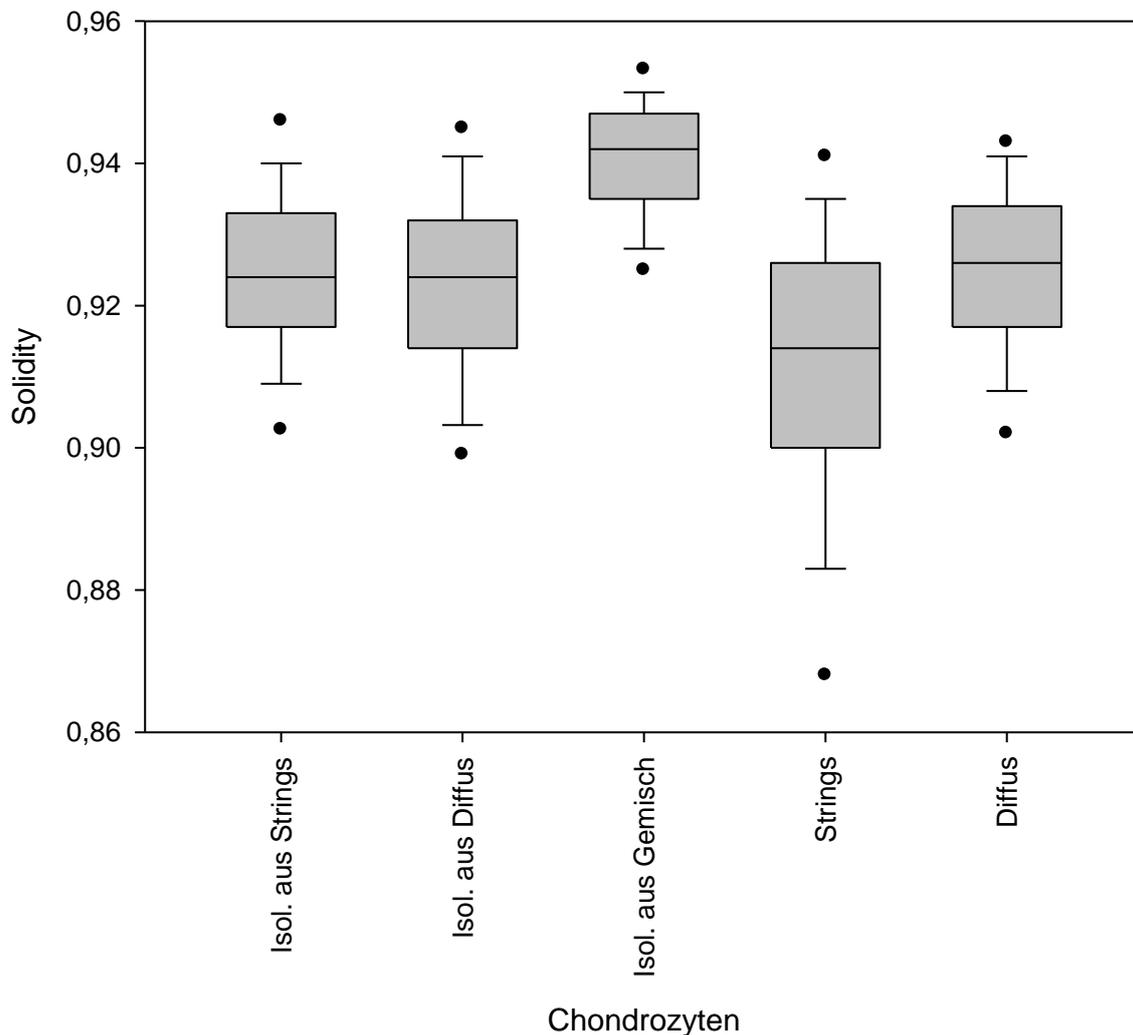


Abb. 36 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Solidity von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. von verschiedenen enzymatischen Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, Isol. aus „Gemisch“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte. (Isoliert aus „Strings“: n= 110 Chondrozyten, Isoliert aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: n= 135 Chondrozyten, „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

Ergebnisse

In Bezug auf den Shape Deskriptor Solidity, welcher ebenfalls Aussagen über die Anzahl der Membranprotrusionen trifft, zeigten sich, bis auf eine Ausnahme, die gleichen Ergebnisse wie beim Shape Deskriptor Circularity. Hinzu kam lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den diffus organisierten Chondrozyten im Gewebe und den isolierten Chondrozyten aus einer „diffusen“ Probe (s. Tabelle 16).

Tabelle 16 Statistischer Vergleich von Chondrozyten verschiedener superfiziell räumlicher Organisationsformen („Strings“, „Diffus“) bzw. enzymatisch isolierter superfizieller Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, Isol. aus „Gemisch“) in Bezug auf die Ausprägung verschiedener Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity). Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Tests (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde. (Isoliert aus „Strings“: $n = 110$, Isoliert aus „Diffus“: $n = 140$ Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: $n = 135$ Chondrozyten, „Strings“: $n = 1481$ Chondrozyten, „Diffus“: $n = 839$ Chondrozyten).

Shape Deskriptor		Isol. aus „Diffus“	Isol. aus Gemisch	„Strings“ im Gewebe	„Diffus“ im Gewebe
Aspect Ratio	Isol. aus „Strings“			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Isol. aus „Diffus“			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Isol. aus Gemisch			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Strings“				$p < 0,001$
Roundness	Isol. aus „Strings“			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Isol. aus „Diffus“			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Isol. aus Gemisch			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Strings“				$p < 0,001$
Circularity	Isol. aus „Strings“		$p < 0,001$	$p < 0,001$	
	Isol. aus „Diffus“		$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Isol. aus Gemisch			$p < 0,001$	$p < 0,001$
	„Strings“				$p < 0,001$

Solidity	Isol. aus „Strings“		p<0,001	p<0,001	
	Isol. aus „Dif-fus“		p<0,01	p<0,001	
	Isol. aus Ge-misch			p<0,001	p<0,001
	„Strings“				p<0,001

Zusammengefasst wurde erarbeitet, dass superfizielle Chondrozyten im Zuge der enzymatischen Isolation, unabhängig ihrer vorherigen räumlichen Organisationsform, ihre zellgeometrischen Charakteristika größtenteils verlieren. Es wurde beobachtet, dass die Chondrozyten im isolierten Stadium einen kleineren Aspect Ratio, eine größere Roundness, eine größere Circularity, sowie eine größere Solidity als die Chondrozyten im Gewebe aufwiesen. Somit wurde gezeigt, dass superfizielle Chondrozyten im isolierten Zustand eher eine abgerundete Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen annahmen und somit eher den Chondrozyten in einer diffus organisierten Anordnung als den Chondrozyten in einer „Strings“-Formation ähnelten. So waren die Chondrozyten der verschiedenen Isolationsansätze in Bezug auf die vier Shape Deskriptoren AR, Round, Circ und Sol um max. 7,0 % anders als die in vitro-Chondrozyten mit einer diffusen Organisation, während zu den „Strings“-Chondrozyten ein max. Unterschied von bis zu 29,7 % bestand (s. Tabelle 17).

Innerhalb der drei Isolationsansätze waren zwischen den Proben in Bezug auf die Shape Deskriptoren Aspect Ratio und Roundness keine signifikanten Unterschiede detektierbar. Die isolierten Chondrozyten hatten in dieser Hinsicht also die gleiche Zellmorphologie. In Bezug auf die Shape Deskriptoren Circularity und Solidity zeigten sich signifikante Unterschiede (s. Tabelle 16). Da sich die Chondrozyten in Bezug auf ihre Shape Deskriptoren innerhalb der drei Isolationsansätze jedoch nur um max. 2,8 % (Circularity Isol. aus „Strings“ vs. „Isol. aus „Gemisch“, s. Tabelle 17) voneinander unterschieden, erschien es trotz statistisch signifikanter Unterschiede legitim für die Gewinnung von Chondrozyten für das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen makroskopisch intakten, nicht weiter klassifizierten Knorpel zu verwenden.

Tabelle 17 Prozentuale Änderung der Zellgeometrie in Bezug auf die Shape Deskriptoren zwischen isolierten superfiziellen Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze und superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenkknorpel. Der Vergleich der prozentualen Änderung der Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity) erfolgte zwischen superfiziellen Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus „Diffus“, „Isol. aus Gemisch) und in vivo-Chondrozyten aus dem humanen Kniegelenksgewebe mit einer „Strings“- bzw. einer „diffusen“ Formation. Für die Berechnung wurden die arithmetischen Mittelwerte verwendet. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde (Isolierte Chondrozyten: Isol. aus „Strings“: n= 110, Isol. aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isol. aus Gemisch: n= 135 Chondrozyten; im Gewebe; „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

		Isol. aus "Diffus".	Isol. aus "Gemisch".	"Strings" im Gewebe	"Diffus" im Gewebe
Aspect Ratio	Isol. aus „Strings“.	2,1%	2,8%	-24,3%	-4,4%
	Isol. aus "Diffus"		0,6%	-25,9%	-6,4%
	Isol. aus "Gemisch"			-26,3%	-7,0%
Roundness	Isol. aus „Strings“.	-1,7%	-2,0%	27,1%	4,2%
	Isol. aus "Diffus"		-0,3%	29,3%	6,0%
	Isol. aus "Gemisch"			29,7%	6,4%
Circularity	Isol. aus „Strings“.	-1,1%	-2,8%	8,3%	0,5%
	Isol. aus "Diffus"		-1,7%	9,5%	1,6%
	Isol. aus "Gemisch"			11,4%	3,4%
Solidity	Isol. aus „Strings“.	0,1%	-1,7%	1,4%	-0,1%
	Isol. aus "Diffus"		-1,8%	1,3%	-0,2%
	Isol. aus "Gemisch"			3,2%	1,6%

3.1.3 Verwendung geometrisch definierter Mikro-Adhäsionsflächen zur Kontrolle der geometrischen Zellmorphologie superfizieller, isolierter Chondrozyten

3.1.3.1 Vergleich der Zellgeometrien superfizieller Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel mit superfiziellen, isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Phänotyp superfizieller, isolierter Chondrozyten über die externe Kontrolle der geometrischen Zellmorphologie in ihrem Phänotyp zu beeinflussen. Hierdurch wäre es theoretisch möglich Osteoarthrose-erkrankte Chondrozyten, hier repräsentiert mittels diffus organisierte Chondrozyten, durch die Veränderung ihrer geometrisch-charakteristischen Eigenschaften (s. Kapitel 3.1.1) in ein gesünderes Stadium, hier repräsentiert durch Chondrozyten in der „Strings“-Formation, zu überführen. Zur Kontrolle der geometrischen Zellmorphologie wurden in dieser Arbeit fibronektinbeschichtete Mikroadhäsionsflächen der Firma CYTOO verwendet (=CYTOOchips). Die Mikroadhäsionsflächen des „Starter-Pakets“ waren bereits mit vier verschiedenen Geometrien bestückt: Crossbow, H, O, Y (s. Abb. 19 in Kapitel 2.2.7). Die passenden Mikroadhäsions-Geometrien für die Repräsentation der räumlichen Organisationsformen „Strings“ und „Diffus“ wurden anhand der prozentualen Änderungen der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „Strings“ zu „Diffus“ ausgewählt. Hierfür wurden die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 der *in vivo* analysierten Chondrozyten mit geometrisch-kontrollierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit den Geometrien Crossbow, H, O und Y aus der Inaugural-Dissertation von S. Hermann mit dem Titel „Understanding osteoarthritis: how do cells lose orientation during proliferation“ verglichen. Die Methodik der beiden Arbeiten unterschied sich in der Art der Zellfärbung (S. Hermann: Tubulinfärbung; hier: Calcein-AM-Färbung). Beide Färbemethoden sind jedoch dazu in der Lage, Chondrozyten in ihrem vollständigen Umfang darzustellen (Tubulin: Darstellung des intrazellulären Zytoskeletts, Calcein-AM: Anreicherung im Zytoplasma). Hierdurch war es legitim, einen annähernden Vergleich der Zellbilder aus beiden Arbeiten anhand der Analyse der Shape Deskriptoren durchzuführen und anschließend die bestpassende Auswahl aus den vier möglichen Mikroadhäsionsflächen für die weitere

Ergebnisse

Durchführung der vorliegenden Arbeit zu treffen. Auf Grund der Erkenntnisse von Rolauffs und Aicher wurden für die vorliegende Dissertation Chondrozyten in der „Strings“-Formation als „gesund“ und diffus organisierten Chondrozyten als „krank“ definiert (Aicher and Rolauffs, 2014).

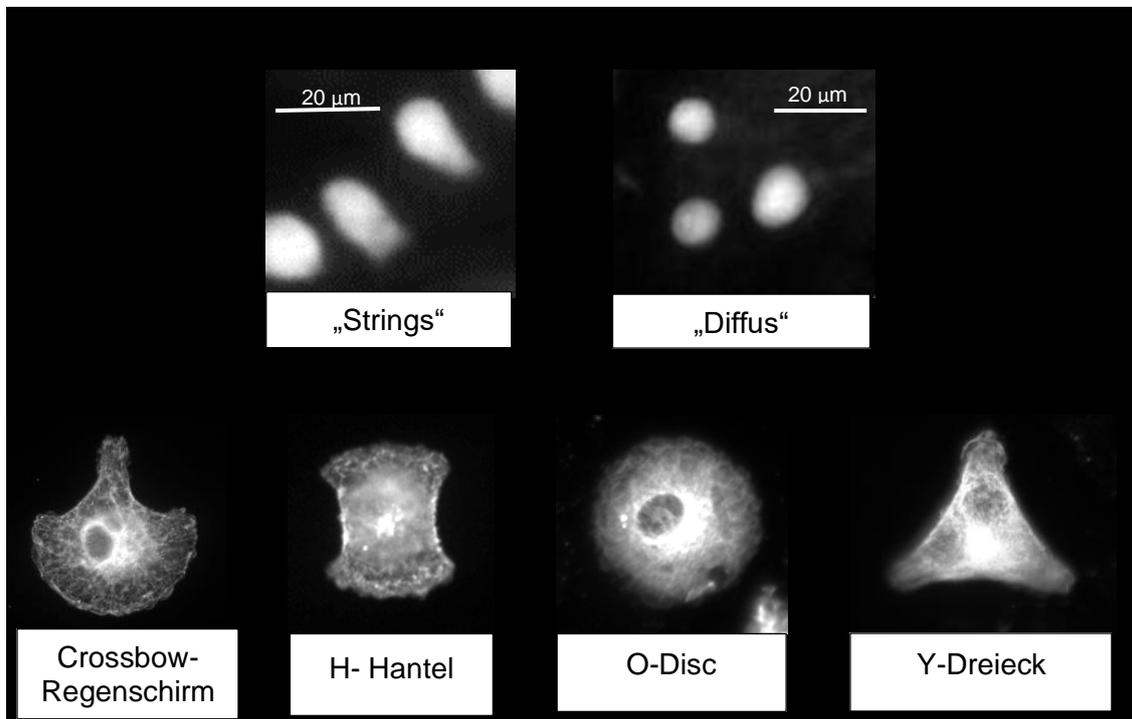


Abb. 37 Verschiedene Zellgeometrien von humanen Kniegelenks-Chondrozyten.
Obere Reihe: Superfizielle Chondrozyten im humanen, hyalinen Kniegelenksknorpel. Links: Chondrozyten in der „Strings“-Formation, rechts: Chondrozyten mit einer diffus organisierten Anordnung. Calcein-AM-Färbung, 10 x- Objektiv, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop, Blick „von oben“ auf die Gelenkfläche; **Untere Reihe:** Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit entsprechender definierter Zellgeometrie. Von links nach rechts: Crossbow - Regenschirm, H - Hantel, O - Disc, Y - Dreieck. Tubulinfärbung, 20x-Objektiv, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop, Blick „von oben“ auf den „CYTOOchip“ ((Hermann, 2017)).

Für die Identifikation derjenigen biomimetischen Adhäsionsflächen, welche als Modellsystem für gesunde vs. erkrankte Zellgeometrien verwendet werden konnten, wurde von in-vivo-Chondrozyten die prozentuale Veränderung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „Strings“ nach „Diffus“ bestimmt und mit den prozentualen Veränderungen der Shape Deskriptoren von Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen zwischen

verschiedenen Zellgeometrien (H, Crossbow, O und Y) verglichen, um diejenige Kombination aussuchen zu können, die den OA-induzierten Veränderungen der Zellgeometrien im Gewebe nahe kamen.

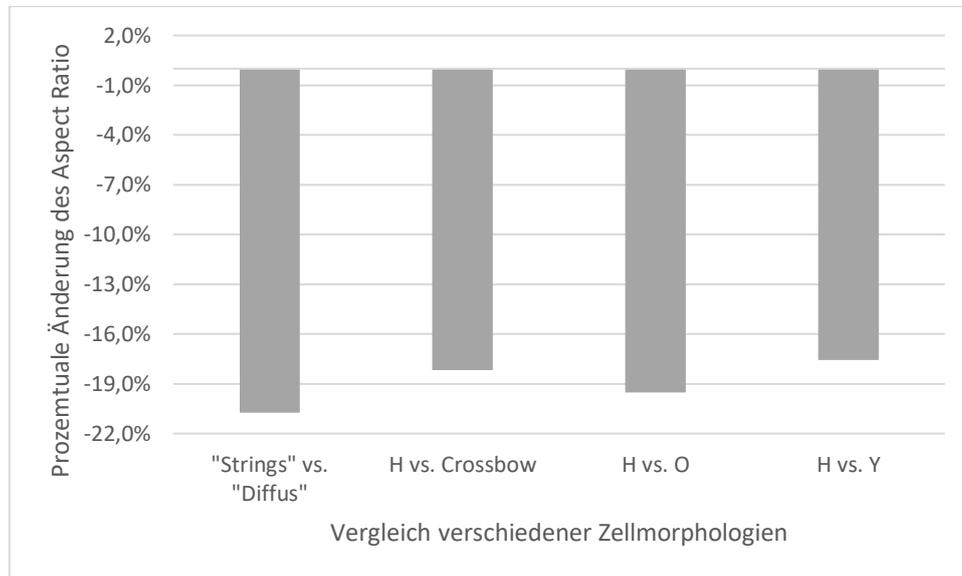


Abb. 38 Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Aspect Ratio zwischen verschiedenen Zellmorphologien. Der Vergleich der prozentualen Änderung des Shape Deskriptors Aspect Ratio erfolgte zum einen zwischen den räumlichen Organisationsformen „Strings“ vs. „Diffus“ im hyalinen Kniegelenksknorpel und zum anderen zwischen der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und anderen microengineerten Zellgeometrien (Crossbow, O, Y).

In vivo, im Gewebe, änderte sich der Shape Deskriptor Aspect Ratio der Chondrozyten von „Strings“ zu diffus organisierten Chondrozyten um -20,7 %. In vitro, auf den Mikroadhäsionsflächen, lag die prozentuale Änderung des AR der Chondrozyten zwischen -17,6 % (H vs. Y) und -19,5 % (H vs. O) (s. Tabelle 18).

Ergebnisse

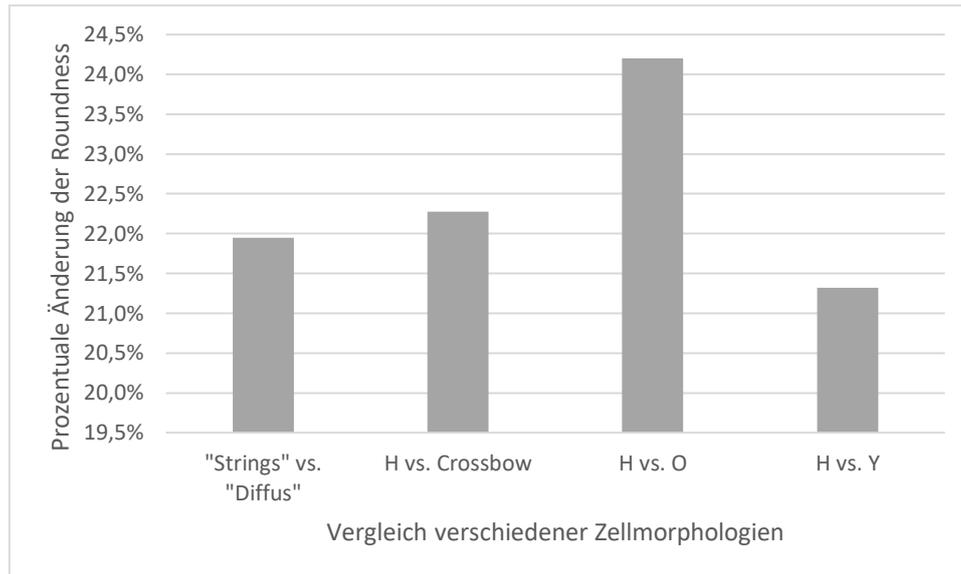


Abb. 39 Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Roundness zwischen verschiedenen Zellmorphologien. Der Vergleich der prozentualen Änderung des Shape Deskriptors Roundness erfolgte zum einen zwischen den räumlichen Organisationsformen „Strings“ vs. „Diffus“ im hyalinen Kniegelenksknorpel und zum anderen zwischen der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und anderen microengineerten Zellgeometrien (Crossbow, O, Y).

In vivo, im Gewebe, änderte sich der Shape Deskriptor Roundness der Chondrozyten von „Strings“ zu diffus organisierten Chondrozyten um 22 %. In vitro, auf den Mikroadhäsionsflächen, lag die prozentuale Änderung der Roundness der Chondrozyten zwischen 21,3 % (H vs. Y) und 24,2 % (H vs. O) (s. Tabelle 18).

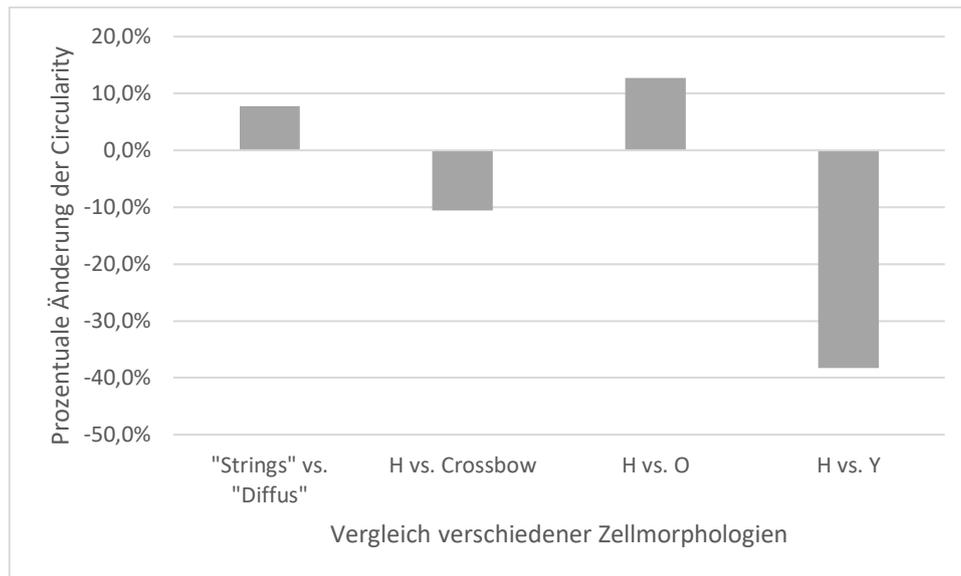


Abb. 40 Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Circularity zwischen verschiedenen Zellmorphologien. Der Vergleich der prozentualen Änderung des Shape Deskriptors Circularity erfolgte zum einen zwischen den räumlichen Organisationsformen „Strings“ vs. „Diffus“ im hyalinen Kniegelenksknorpel und zum anderen zwischen der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und anderen microengineerten Zellgeometrien (Crossbow, O, Y).

In vivo, im Gewebe, änderte sich der Shape Deskriptor Circularity der Chondrozyten von „Strings“ zu diffus organisierten Chondrozyten um 7,8 %. In vitro, auf den Mikroadhäsionsflächen, lag die prozentuale Änderung der Circularity der Chondrozyten zwischen -38,3 % (H vs. Y) und 12,7 % (H vs. O) (s. Tabelle 18).

Ergebnisse

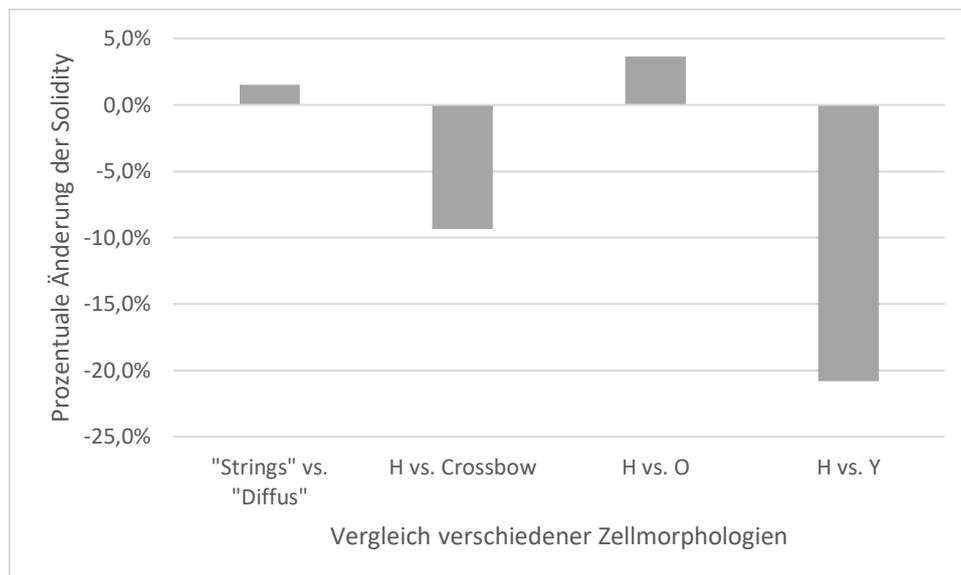


Abb. 41 Prozentuale Änderung des Shape Deskriptors Solidity zwischen verschiedenen Zellmorphologien. Der Vergleich der prozentualen Änderung des Shape Deskriptors Solidity erfolgte zum einen zwischen den räumlichen Organisationsformen „Strings“ vs. „Diffus“ im hyalinen Kniegelenksknorpel und zum anderen zwischen der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und anderen microengineerten Zellgeometrien (Crossbow, O, Y).

In vivo, im Gewebe, änderte sich der Shape Deskriptor Solidity der Chondrozyten von „Strings“ zu diffus organisierten Chondrozyten um 1,5 %. In vitro, auf den Mikroadhäsionsflächen, lag die prozentuale Änderung der Circularity der Chondrozyten zwischen -20,8 % (H vs. Y) und 3,7 % (H vs. O) (s. Tabelle 18).

Tabelle 18 Prozentuale Änderung verschiedener Shape Deskriptoren zwischen verschiedenen Zellmorphologien. Der Vergleich der prozentualen Änderung der Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Circularity, Solidity) erfolgte zum einen zwischen den räumlichen Organisationsformen „Strings“ vs. „Diffus“ im hyalinen Kniegelenksknorpel und zum anderen zwischen der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und anderen microengineerten Zellgeometrien (Crossbow, O, Y).

Zellgeometrien	Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren			
	Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
„Strings“ vs. „Diffus“	-20,7 %	22,0 %	7,8 %	1,5 %
H vs. Crossbow	-18,2 %	22,3 %	-10,6 %	-9,4 %
H vs. O	-19,5 %	24,2 %	12,7 %	3,7 %
H vs. Y	-17,6 %	21,3 %	-38,3 %	-20,8 %

Tabelle 19 Differenz der prozentualen Änderungen zwischen der in vivo Kombination „Strings“ vs. „Diffus“ und den in vitro Möglichkeiten („H vs. Crossbow“, „H vs. O“, „H vs. Y“). Die Tabelle zeigt, dass die Kombination der microengineerten Zellgeometrien „H vs. O“ in fast allen Vergleichen der in vivo-Kombination „Strings“ vs. „Diffus“ am ähnlichsten war (fett markiert).

Differenz zwischen der prozentualen Änderung im Gewebe und	Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
H vs. Crossbow	-2,6 %	-0,3 %	18,4 %	10,9 %
H vs. O	-1,2 %	-2,2 %	-5,0 %	-2,1 %
H vs. Y	-3,2 %	0,6 %	46,0 %	22,3 %

Die Kombination der Mikroadhäsionsflächen „H-Shape“ und „O-Shape“ besaß in drei der vier Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Circularity, Solidity) die geringste Differenz zu der prozentualen Änderung der Shape Deskriptoren im Gewebe und in vivo (s. Tabelle 19). Lediglich in Bezug auf den Shape Deskriptor Roundness war die Differenz in der Kombination „H vs. Crossbow“ stimmiger. Da drei der vier Shape Deskriptoren jedoch eindeutig für die Kombination „H vs. O“ sprachen, wurde diese Kombination für die Repräsentation der superfiziellen Chondrozyten im Modellsystem gewählt. Im Folgenden wurden daher die Chondrozyten der „Strings“-Formationen durch den „H-Shape“ und die diffus organisierten Chondrozyten durch den „O-Shape“ repräsentiert. Somit wurde der „H-Shape“ als „gesunde“ und der „O-Shape“ als „kranke“ Morphologie definiert. Ist im Folgenden von „H-Shape“ bzw. „O-Shape“ die Rede, sind die Chondrozyten mit der geometrisch-kontrollierten Zellform auf den Mikroadhäsionsflächen, nicht die Schablonen an sich, gemeint.

3.1.3.2 Vergleich von superfiziellen Chondrozyten mit einer elliptisch- bzw. rundlich-geometrischen Zellmorphologie

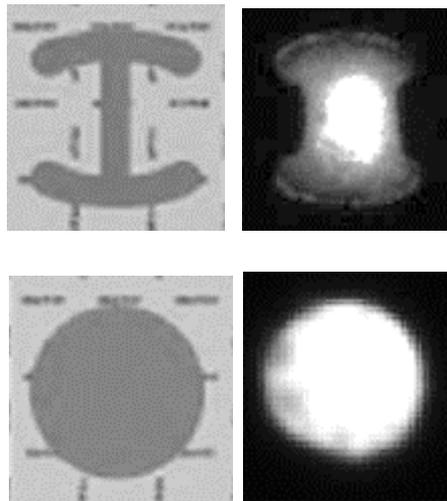


Abb. 42 Geometrisch-kontrollierte Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen.
Links: Schematische Darstellung der Zellgeometrieschablonen „H-Shape“ (oben) und „O-Shape“ (unten); **Rechts:** Einzelne, superfizielle, isolierte Chondrozyten, die sich auf den Fibronektin beschichteten Mikroadhäsionsflächen adhärirt und entsprechend der vorgegebenen Zellgeometrie ausgebreitet haben. (20 x-Objektiv, Calcein-AM-Färbung, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop, Nativbild)

Im Folgenden wurde für jeden Versuch des folgenden Kapitels für jeweils beide Mikroadhäsionsflächen simultan die gleiche Population isolierter superfizieller Chondrozyten aus makroskopisch intaktem Knorpel verwendet. So wiesen alle Chondrozyten die gleichen Ausgangsbedingungen auf. Eine entsprechend ausreichend hohe Zellzahl wurde durch das Poolen von Chondrozyten aus makroskopisch intaktem Knorpel garantiert. Um sicherzugehen, dass diese Herangehensweise legitim war, wurde vorab die Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von superfiziellen Chondrozyten aus verschiedenen räumlichen Organisationsformen („Isol. aus „Strings““, „Isol. aus „Diffus““, „Isol. aus „Gemisch““) nach der enzymatischen Isolation auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht (s. Kapitel 3.1.2).

Für die Analyse der Shape Deskriptoren der superfiziellen, isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen wurden die Mikroskop-Aufnahmen vorab anhand eines Thresholds in schwarz-weiß-Bilder umgewandelt. Dieser Zwischenschritt war notwendig, da die hauchdünnen Mikrochips im Vergleich zu den

300 μm dicken Knorpeldiscs eine geringere Dichte und somit einen geringeren Kontrast aufwiesen. Erst durch die Erstellung des Thresholds konnten die Chondrozyten reproduzierbar analysiert werden.

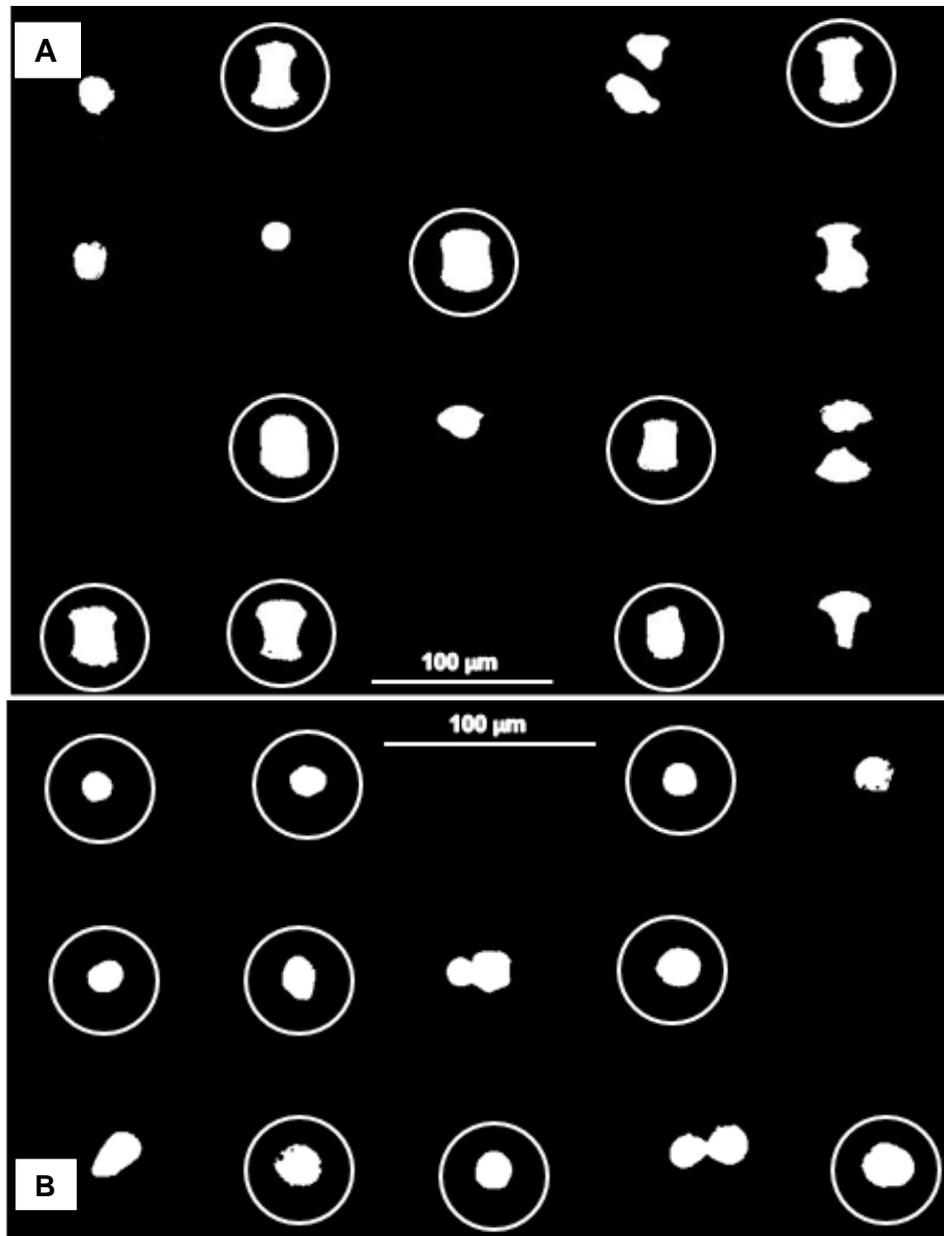


Abb. 43 *Übersichtsaufnahmen von superfiziellen, isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen.* Auf den Bildern sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von superfiziellen, isolierten Chondrozyten zu sehen, welche für 24 Stunden auf der Mikroadhäsionsfläche inkubiert und anschließend mit Calcein-AM gefärbt wurden. Die Übersicht zeigt sowohl Chondrozyten, die die geforderte Zellgeometrien angenommen haben, als auch Chondrozyten, die sich zwar auf eine Fibronektinschablone gesetzt, ihre Zellgeometrie jedoch nicht oder nur teilweise verändert haben, bzw. sich durch

Ergebnisse

doppelte Besetzung in ihrer Ausbreitung gegenseitig behinderten. Analyisierte Chondrozyten wurden durch einen Kreis markiert. A: „H-Shape“, B: „O-Shape“ (10 x-Objektiv, Calcein-AM-Färbung, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop, Threshold-Bild).

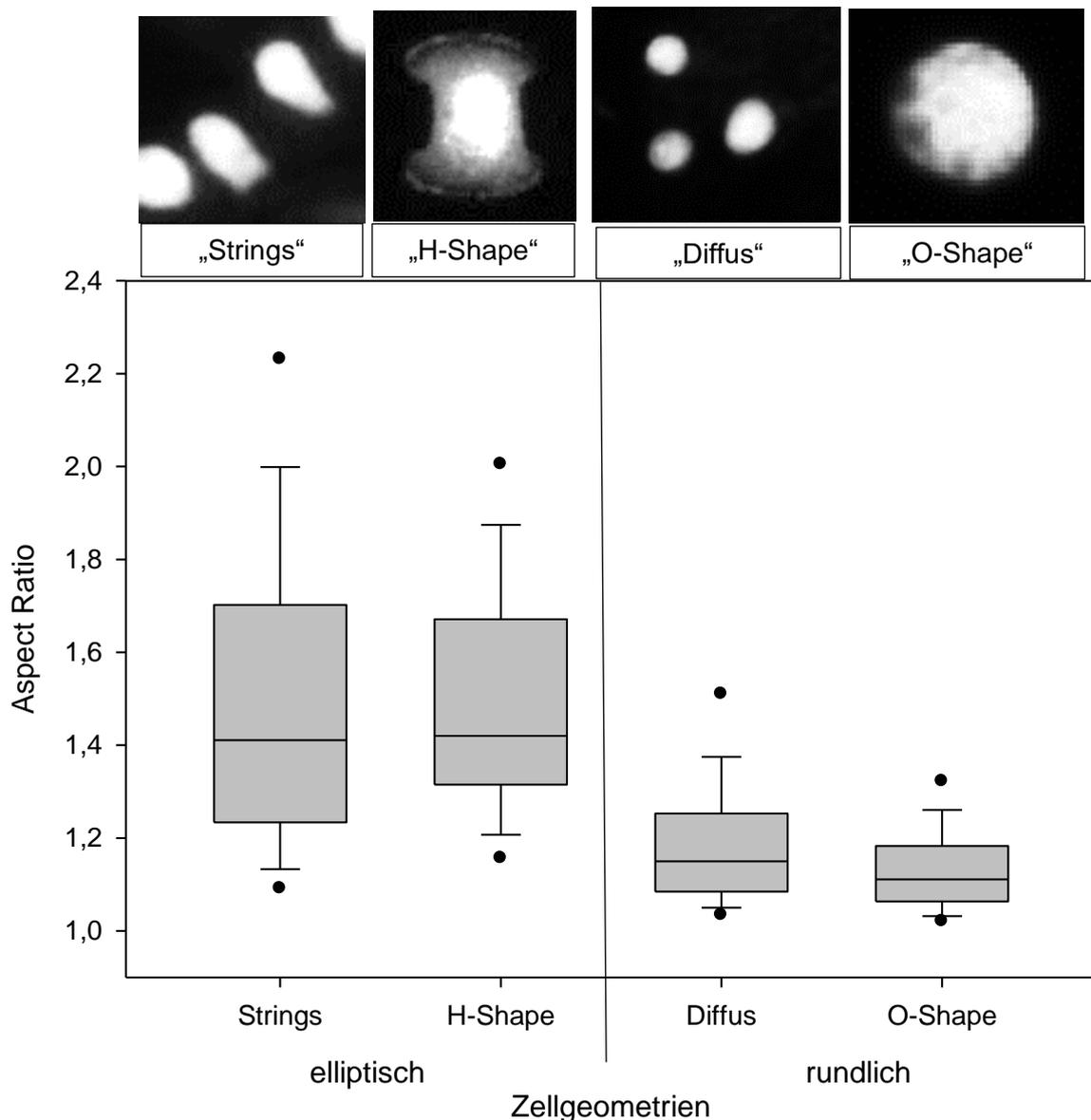


Abb. 44 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Aspect Ratio von superfiziellen Chondrozyten mit elliptischer Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) und rundlicher Zellgeometrie („Diffus“, „O-Shape“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten, „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten). (Bilder: Calcein-AM-Färbung, 10 x-Objektiv, LSM 510 Fluoreszenzmikroskop)

Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie zeigten durchschnittlich einen höheren Aspect Ratio ($AR(\text{„Strings“}) = 1,508 \pm 0,01$, $AR(\text{„H-Shape“}) = 1,491 \pm 0,026$) als Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie ($AR(\text{„Diffus“}) = 1,195 \pm 0,006$, $AR(\text{„O-Shape“}) = 1,134 \pm 0,009$, s. Tabelle 35). Dabei unterschieden sich die AR-Werte innerhalb der elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie um maximal 5,4 % voneinander (s. Tabelle 20). Der Shape Deskriptor Aspect Ratio blieb innerhalb der elliptischen Zellgeometrie zwischen superfiziellen Chondrozyten der „Strings“-Formation und superfiziell, isolierten Chondrozyten mit der Zellgeometrie „H-Shape“ statistisch unverändert, nahm aber von Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) vs. Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie („Diffus“, „O-Shape“) signifikant ab. Zwischen den rundlich geformten Chondrozyten wurde eine statistische Veränderung festgestellt (s. Tabelle 22). Da jedoch der prozentuale Unterschied des Aspect Ratio zwischen den rundlich geformten Chondrozyten nur 5,4 % betrug, war trotzdem von einer großen Ähnlichkeit zwischen den zwei rundlichen Zellgeometrien auszugehen (s. Tabelle 20).

Beim Vergleich der superfiziellen, isolierten, zellgeometrisch-kontrollierten Chondrozyten wurde in Bezug auf den Shape Deskriptor Aspect Ratio erarbeitet, dass durch die Veränderung der Zellmorphologie von rundlich („O-Shape“) zu elliptisch („H-Shape“) der Aspect Ratio um 31,5 % gesteigert wurde, was im Sinne der OA-induzierten pathologischen Veränderung der Morphologie einer Verbesserung der Zellgeometrie entspricht. Diese übertraf den natürlichen Unterschied in dem AR zwischen humanem gesundem („Strings“) und osteoarthrotischem Knorpelgewebe („Diffus“) (26,2 %) (s. Tabelle 21).

Ergebnisse

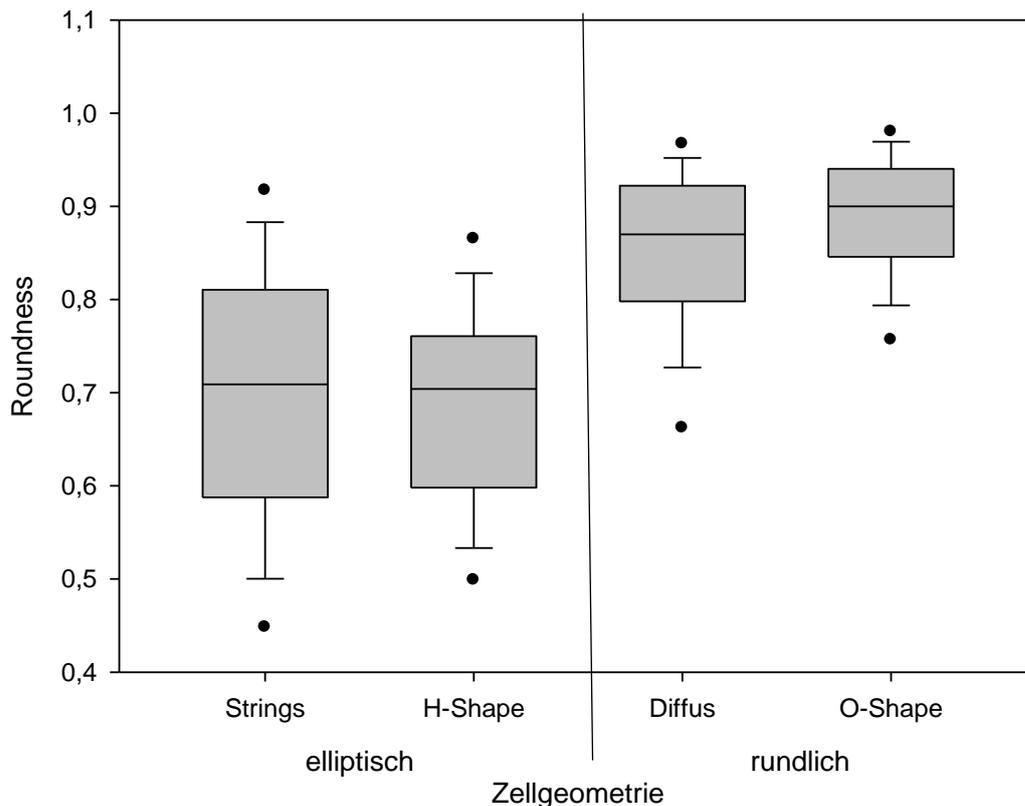


Abb. 45 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Roundness von superfiziellen Chondrozyten mit elliptischer Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) und rundlicher Zellgeometrie („Diffus“, „O-Shape“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte („Strings“: n= 1481 Chondrozyten von, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten, „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten).

Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie zeigten durchschnittlich eine geringere Roundness (Round(„Strings“) = $0,697 \pm 0,004$, Round(„H-Shape“) = $0,690 \pm 0,011$), als Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie (Round(„Diffus“) = $0,850 \pm 0,003$, Round(„O-Shape“) = $0,888 \pm 0,006$, s. Tabelle 35). Dabei unterschieden sich die Werte für die Roundness innerhalb der elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie um maximal 4,3 % voneinander (s. Tabelle 20). Der Shape Deskriptor Roundness blieb innerhalb der elliptischen Zellgeometrie zwischen superfiziellen Chondrozyten der „Strings“-Formation und superfiziellen, isolierten Chondrozyten mit der Zellgeometrie „H-Shape“ statistisch unverändert, aber nahm von Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) vs. Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie

(„Diffus“, „O-Shape“) signifikant zu. Zwischen den rundlich geformten Chondrozyten wurde eine statistische Veränderung festgestellt. Da jedoch der prozentuale Unterschied der Roundness zwischen den rundlich geformten Chondrozyten nur 4,3 % betrug, war trotzdem von einer großen Ähnlichkeit zwischen den zwei rundlichen Zellgeometrien auszugehen (s. Tabelle 20). In Bezug auf den Shape Deskriptor Roundness wurde erarbeitet, dass durch Veränderung der Zellmorphologie von isolierten superfiziellen Chondrozyten, hier von rundlich („O-Shape“) zu elliptisch („H-Shape“), die Roundness um 22,3 % gesenkt wurde, was einer Verbesserung der Zellgeometrie entspricht. Diese Veränderung übertraf sogar die natürliche Senkung der Roundness im humanen Kniegelenkknorpel (18,0 %) (s. Tabelle 21).

Ergebnisse

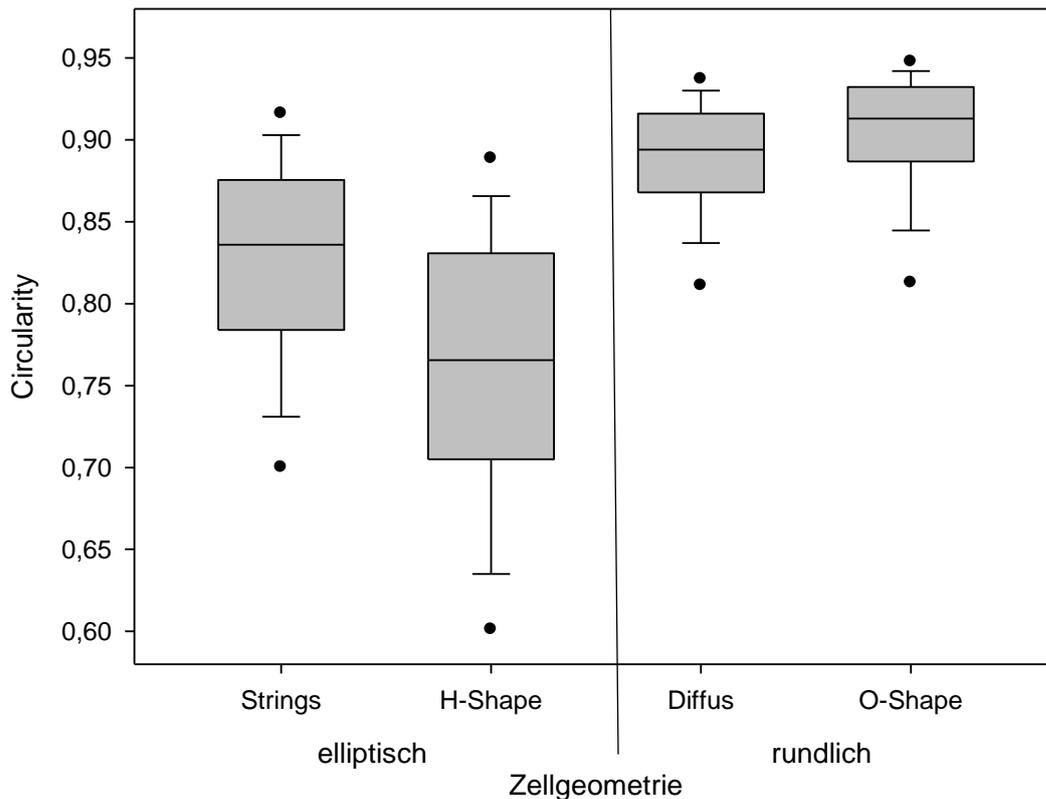


Abb. 46 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors *Circularity* von superfiziellen Chondrozyten mit elliptischer Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) und rundlicher Zellgeometrie („Diffus“, „O-Shape“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte („Strings“: $n= 1481$ Chondrozyten, „Diffus“: $n= 839$ Chondrozyten, „H-Shape“: $n= 100$ Chondrozyten, „O-Shape“: $n= 146$ Chondrozyten).

Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie zeigten durchschnittlich eine geringere *Circularity* ($\text{Circ}(\text{„Strings“}) = 0,824 \pm 0,002$, $\text{Circ}(\text{„H-Shape“}) = 0,762 \pm 0,009$), als Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie ($\text{Circ}(\text{„Diffus“}) = 0,888 \pm 0,001$, $\text{Circ}(\text{„O-Shape“}) = 0,902 \pm 0,003$, s. Tabelle 35). Dabei unterschieden sich die Werte für die *Circularity* innerhalb der elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie um maximal 8,1 % voneinander (s. Tabelle 20). Der Shape Deskriptor *Circularity* zeigte in allen Vergleichen (zwischen bzw. innerhalb der rundlichen und elliptischen Zellgeometrien) signifikante Unterschiede. In Bezug auf den Shape Deskriptor *Circularity* wurde also erarbeitet, dass durch die Veränderung der Zellmorphologie von isolierten superfiziellen Chondrozyten, hier von rundlich („O-Shape“) zu elliptisch („H-Shape“), die *Circularity* um 15,5 % gesenkt wurde, was einer Verbesserung der Zellgeometrie entspricht. Diese

übertraf die natürliche Senkung der Circularity im humanen Kniegelenksknorpel (7,2 %) (s. Tabelle 21).

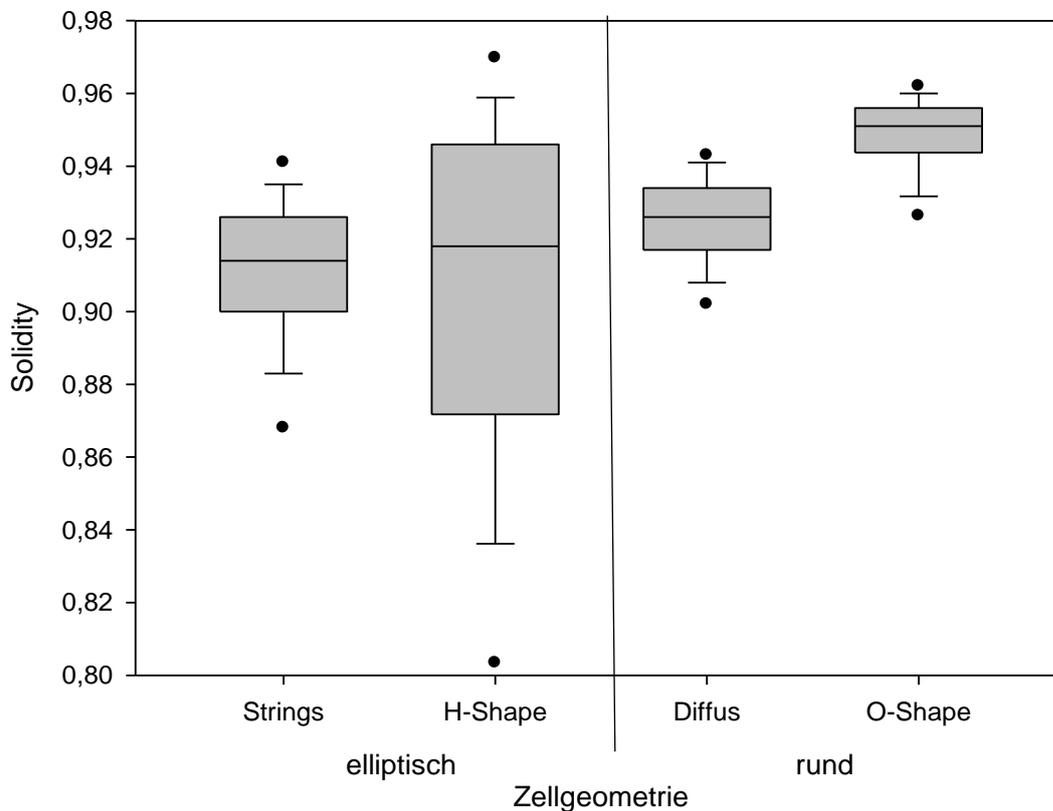


Abb. 47 Boxplot-Diagramm: Ausprägung des Shape Deskriptors Solidity von superfiziellen Chondrozyten mit elliptischer Zellgeometrie („Strings“, „H-Shape“) und rundlicher Zellgeometrie („Diffus“, „O-Shape“). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile, sowie die 5te und 95te Perzentile als schwarze Punkte („Strings“: $n= 1481$ Chondrozyten, „Diffus“: $n= 839$ Chondrozyten, „H-Shape“: $n= 100$ Chondrozyten, „O-Shape“: $n= 146$ Chondrozyten).

Chondrozyten mit einer elliptischen Zellgeometrie zeigten durchschnittlich eine geringere Solidity ($Sol(\text{„Strings“}) = 0,911 \pm 0,001$, $Sol(\text{„H-Shape“}) = 0,906 \pm 0,005$), als Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie ($Sol(\text{„Diffus“}) = 0,925 \pm 0,0004$, $Sol(\text{„O-Shape“}) = 0,948 \pm 0,001$, s. Tabelle 35). Dabei unterschieden sich die Werte für die Solidity innerhalb der elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie um maximal 2,4 % voneinander (s. Tabelle 20). Der Shape Deskriptor Solidity zeigte in allen Vergleichen (zwischen bzw. innerhalb der

Ergebnisse

rundlichen und elliptischen Zellgeometrien) signifikante Unterschiede. In Bezug auf den Shape Deskriptor Solidity wurde erarbeitet, dass durch die Veränderung der Zellmorphologie von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit geometrisch-kontrollierter Zellform die Solidity von rundlich („O-Shape“) zu elliptisch („H-Shape“) um 4,4 % gesenkt wurde, was einer Verbesserung der Zellgeometrie entspricht. Diese übertraf sogar die natürliche Senkung der Solidity im humanen Kniegelenksknorpel (1,5 %) (s. Tabelle 21).

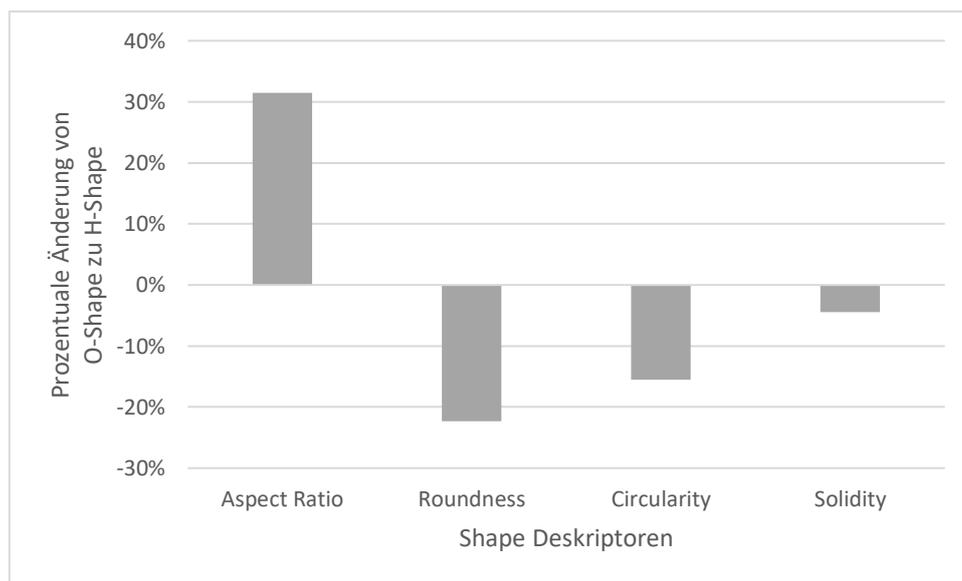


Abb. 48 Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von „O-Shape“ zu „H-Shape“ Chondrozyten. Für die Berechnung der prozentualen Änderung wurden die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte verwendet. Die Darstellung der prozentualen Änderung erfolgte von „O-Shape“ nach „H-Shape“, von „krank“ nach „gesund“, da dies im Folgenden als therapeutischer Effekt genutzt wurde und so eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet wurde.

Tabelle 20 Prozentualer Unterschied der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity innerhalb verschiedener Zellformen elliptisch/rundlich). Oben: Prozentualer Unterschied der Shape Deskriptoren von superfiziellen Chondrozyten innerhalb einer elliptischen („Strings“, „H-Shape“), bzw. rundlichen („Diffus“, „O-Shape“) Zellgeometrie. Für die Berechnung wurden die arithmetischen Mittelwerte verwendet. Unten: Differenz des prozentualen Unterschieds zwischen der rundlichen und der elliptischen Zellgeometrie (Elliptisch: „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten; rundlich: „Diffus“: n= 839 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten).

Zu vergleichende Zellgeometrien:	Prozentualer Unterschied			
	des Aspect Ratios	der Roundness	der Circularity	der Solidity
Elliptisch („H-Shape“ / „Strings“)	+1,1 %	+1,0 %	+8,1 %	+0,6 %
Rundlich („O-Shape“ / „Diffus“)	+5,4 %	-4,3 %	-1,6 %	-2,4 %
Differenz zw. rundlich und elliptisch	4,3 %	5,3 %	9,7 %	3,0 %

Tabelle 21 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren zwischen den elliptischen und rundlichen Zellgeometrien von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. auf Mikroadhäsionsflächen („H-Shape“, „O-Shape“). Oben: Prozentualer Unterschied der Shape Deskriptoren von superfiziellen Chondrozyten zwischen den elliptischen („Strings“, „H-Shape“), bzw. rundlichen („Diffus“, „O-Shape“) Zellgeometrien. Für die Berechnung wurden die arithmetischen Mittelwerte verwendet. Unten: Differenz des prozentualen Unterschieds zwischen dem geometrisch-kontrollierten Modell und der in vivo Situation im Knorpel (Im Kniegelenksknorpel: „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten; auf Mikroadhäsionsflächen: „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten).

Zu vergleichende Zellgeometrien:	Prozentuale Änderung			
	des Aspect Ratios	der Roundness	der Circularity	der Solidity
Im Kniegelenksknorpel („Diffus“ → „Strings“)	+26,2 %	-18,0 %	-7,2 %	-1,5 %
Auf Mikroadhäsionsflächen („O-Shape“ → „H-Shape“)	+31,5 %	-22,3 %	-15,5 %	-4,4 %
Differenz zwischen dem in vitro-Modell und in vivo	5,3 %	4,3 %	8,3 %	2,9 %

Ergebnisse

Zusammenfassend wurde erarbeitet, dass superfizielle, isolierte Chondrozyten durch die extern beeinflusste Veränderung ihrer Zellgeometrie in ihren zellmorphologischen Charakteristika verändert werden können. So konnten Chondrozyten, die der gleichen Population entstammen, nur durch das Aufbringen auf eine Mikroadhäsionsfläche mit der Fibronektinschablone „H-Shape“ im Vergleich zu der Fibronektinschablone „O-Shape“ mit der Richtungsbeachtung „von „O-Shape“ nach „H-Shape““, um 31,5 % in ihrem Aspect Ratio gesteigert und um 22,3 % in ihrer Roundness, um 15,5 % in ihrer Circularity und um 4,4 % in ihrer Solidity gesenkt werden, also von einer rundlichen Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen in eine elliptische Zellgeometrie mit vielen Membranprotrusionen überführt werden. Diese Verbesserung übertraf sogar das natürliche Verhältnis von superfiziellen, diffus organisierten Chondrozyten zu superfiziellen Chondrozyten in der „Strings“-Formation im humanen Kniegelenkknorpel, da bei String Chondrozyten der Aspect Ratio +26,2 %, die Roundness -18,0 %, die Circularity -7,2 % und die Solidity -1,5 % der Shape Deskriptoren der diffus angeordneten Chondrozyten betrug.

Tabelle 22 Statistischer Vergleich von superfiziellen Chondrozyten der Zellgeometrien elliptisch („Strings“, „H-Shape“) und rundlich („Diffus“, „O-Shape“) in Bezug auf die Ausprägung der Shape Deskriptoren „Aspect Ratio“, „Roundness“, „Circularity“ und „Solidity“. Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Test (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde. („Strings“: $n = 1481$ Chondrozyten, „Diffus“: $n = 839$ Chondrozyten, „H-Shape“: $n = 100$ Chondrozyten, „O-Shape“: $n = 146$ Chondrozyten).

		„H-Shape“	„Diffus“	„O-Shape“
Aspect Ratio	„Strings“		p<0,001	p<0,001
	„H-Shape“		p<0,001	p<0,001
	„Diffus“			p<0,001
Roundness	„Strings“		<0,001	<0,001
	„H-Shape“		<0,001	<0,001
	„Diffus“			<0,001

Circularity	„Strings“	<0,001	<0,001	<0,001
	„H-Shape“		<0,001	<0,001
	„Diffus“			<0,001
Solidity	„Strings“	<0,001	<0,001	<0,001
	„H-Shape“		<0,001	<0,001
	„Diffus“			<0,001

Tabelle 23 Prozentuale Änderung der Shape Deskriptoren zwischen den elliptischen und rundlichen Zellgeometrien von superfiziellen Chondrozyten im humanen Kniegelenksknorpel („Strings“, „Diffus“) bzw. auf Mikroadhäsionsflächen („H-Shape“, „O-Shape“). Prozentualer Unterschied der Shape Deskriptoren von superfiziellen Chondrozyten zwischen den elliptischen („Strings“, „H-Shape“), bzw. rundlichen („Diffus“, „O-Shape“) Zellgeometrien. Für die Berechnung wurden die arithmetischen Mittelwerte verwendet. (Im Kniegelenksknorpel: „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten; auf Mikroadhäsionsflächen: „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten).

		„H-Shape“	„Diffus“	„O-Shape“
Aspect Ratio	„Strings“	1,1% (n. sign.)	26,2%	33,0%
	„H-Shape“		24,8%	31,5%
	„Diffus“			5,4%
Roundness	„Strings“	1,0% (n. sign.)	-18,0%	-21,5%
	„H-Shape“		-18,8%	-22,3%
	„Diffus“			-4,3%
Circularity	„Strings“	8,1%	-7,2%	-8,6%
	„H-Shape“		-14,2%	-15,5%
	„Diffus“			-1,6%
Solidity	„Strings“	0,6%	-1,5%	-3,9%
	„H-Shape“		-2,1%	-4,4%
	„Diffus“			-2,4%

3.2 Relative Kollagen mRNA-Genexpression isolierter, superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen

Nachdem in Kapitel 3.1 die Zellmorphologie superfizieller Chondrozyten unter verschiedenen Bedingungen betrachtet wurde, wurde im Folgenden die relative Kollagen mRNA-Expression der isolierten superfiziellen Chondrozyten sowohl im isolierten Zustand aus den verschiedenen räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“), als auch nach Aufbringen auf die Mikroadhäsionsflächen („H-Shape“, „O-Shape“, s. Kapitel 3.2.3) analysiert.

3.2.1 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen isolierter, superfizieller Chondrozyten in Abhängigkeit der räumlichen Organisation des hyalinen Kniegelenkknorpels

Für die Analyse des phänotypischen Genexpressionsprofils isolierter, superfizieller Chondrozyten im Zuge einer OA-Erkrankung wurde die relativen mRNA-Expressionen der Chondrozyten zwischen den räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) jeweils in Bezug auf einen Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1 und 6A1) untersucht. Ziel war es hierdurch differenzierte Aussagen über das Genexpressionsverhalten der Chondrozyten im Verlauf der OA zu erhalten. In diesem Kapitel wurde das Genexpressionsprofil der Chondrozyten betrachtet, welche nach der Bestimmung ihrer räumlichen Organisationsform direkt enzymatisch isoliert und anschließend ohne weitere manipulierende Zwischenschritte analysiert wurden (im Gegensatz zu den Chondrozyten in Kapitel 3.2.3).

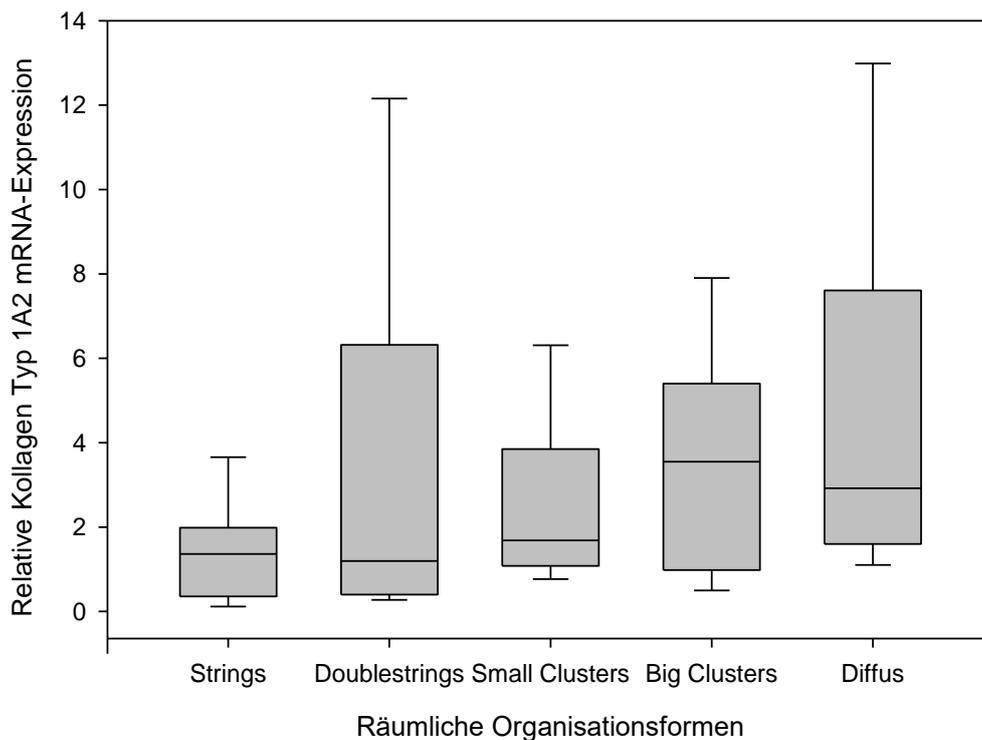
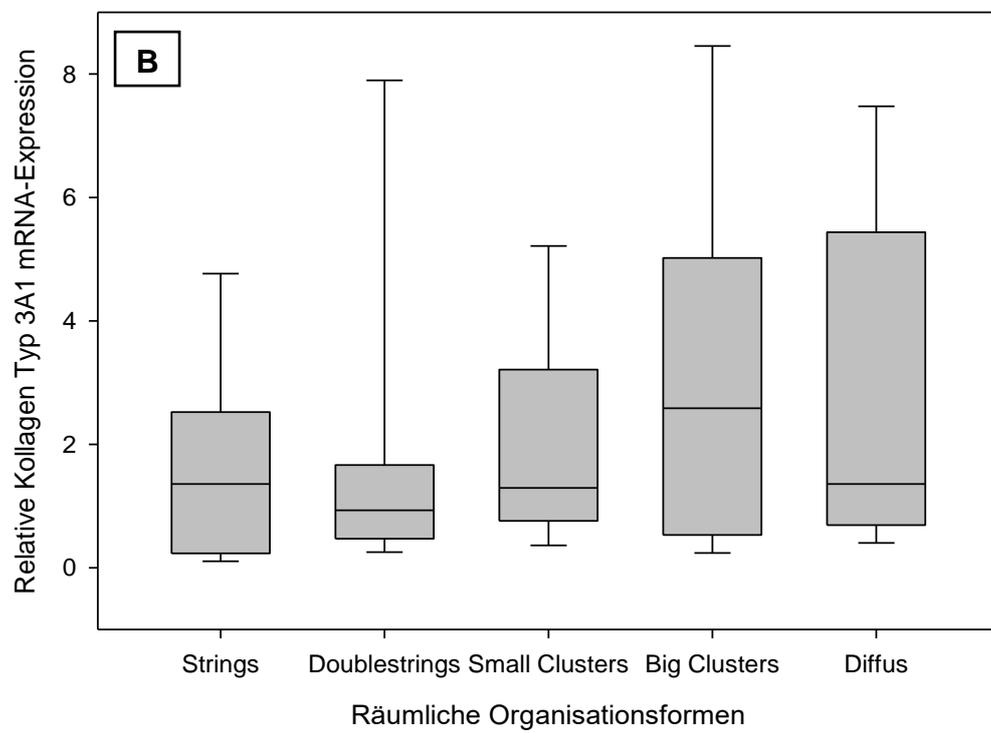
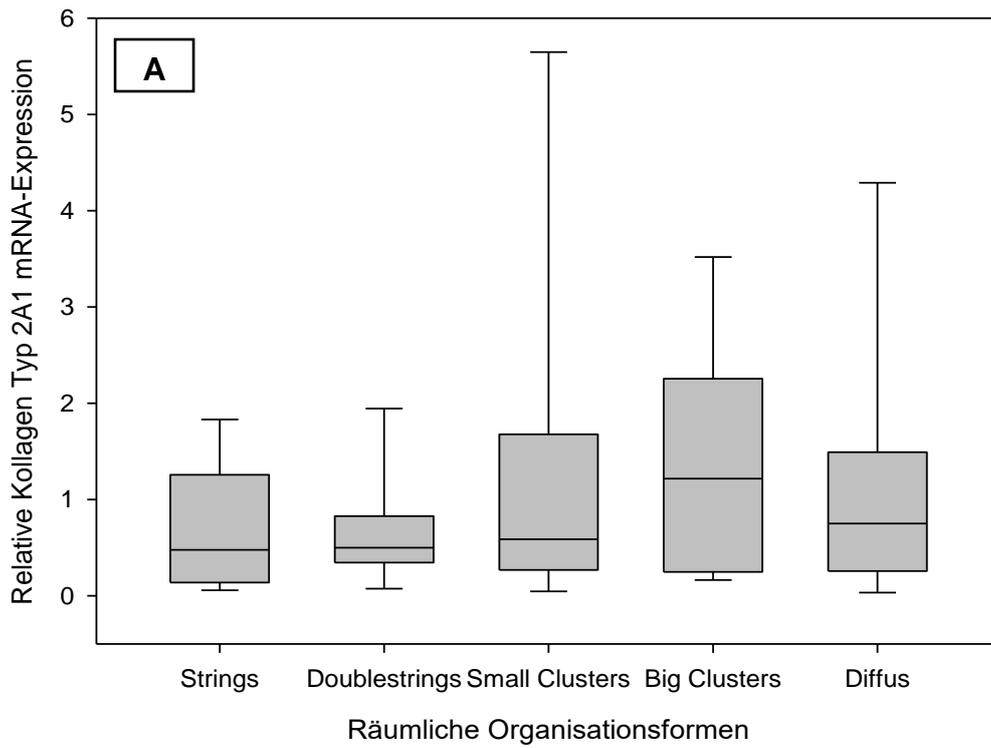


Abb. 49 Boxplot-Diagramm: Relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression isolierter, superfizieller Chondrozyten verschiedener räumlicher Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots setzen sich aus dem Median, den 25ten und 75ten Perzentilen, sowie den Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile zusammen („Strings“: n= 17 Proben, „Doublestrings“: n= 17 Proben, „Small Clusters“: n= 18 Proben, „Big Clusters“: n= 18 Proben, „Diffus“: n= 16 Proben).

Beim Kollagentyp 1A2 verharrte die durchschnittliche mRNA-Expression von „Strings“ bis „Small Clusters“ zunächst auf einem relativ ähnlichen Niveau, stieg in der räumlichen Organisationsform der „Big Clusters“ an und fiel anschließend bei den diffus organisierten Chondrozyten wieder leicht ab. Diese dynamische Veränderung spiegelte sich auch in dem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den „Strings“- und den diffus organisierten Chondrozyten wider ($p=0,08$). Hierbei exprimierten diffus organisierte Chondrozyten durchschnittlich 3,3-fach mehr Kollagentyp 1A2 als Chondrozyten in der „Strings“-Formation. In allen anderen Vergleichen von Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen blieb die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression statistisch unverändert (s. Tabelle 24).

Ergebnisse



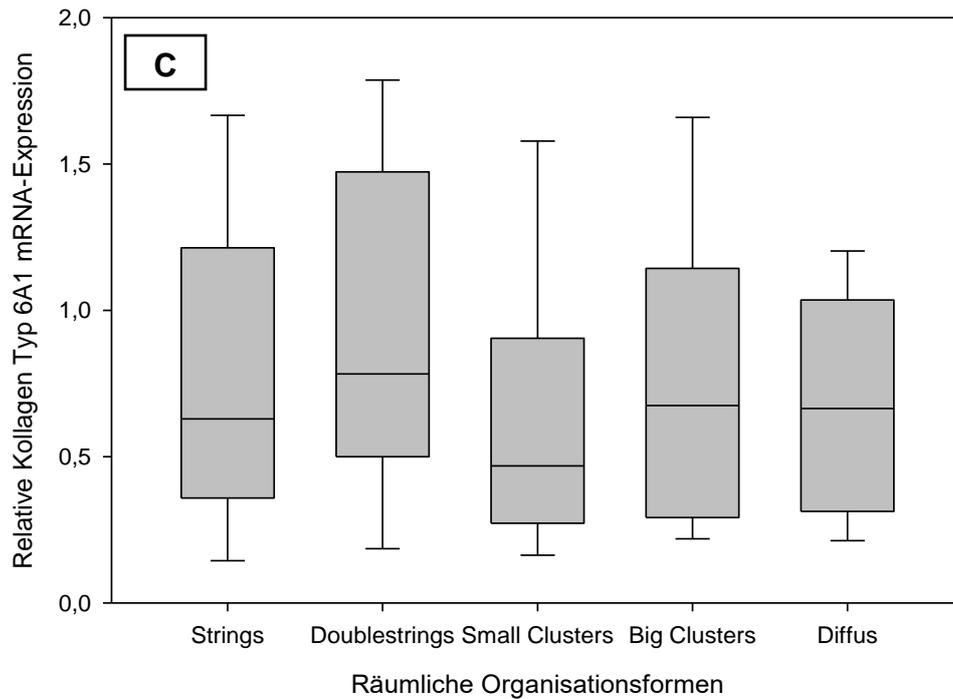


Abb. 50 Boxplot-Diagramm: Relative Kollagen-mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1, 3A1 und 6A1 isolierter, superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Boxplots setzen sich aus dem Median, der 25ten und 75ten Perzentile, sowie den Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile zusammen **A**: Relative Kollagentyp 2A1 mRNA-Expression; **B**: Relative Kollagentyp 3A1 mRNA-Expression; **C**: Relative Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression („Strings“: n= 17 Proben, „Doublestrings“: n= 18 Proben, „Small Clusters“: n= 18 Proben, „Big Clusters“: n= 18 Proben, „Diffus“: n= 16 Proben).

Im Gegensatz dazu blieben die relative Kollagen-mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1, 3A1 und 6A1 zwischen den isolierten, superfiziellen Chondrozyten der räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und diffus organisierten Chondrozyten statistisch unverändert (s. Tabelle 24).

Ergebnisse

Tabelle 24 Statistischer Vergleich der relativen Kollagen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) isolierter, superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Test (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde („Strings“: $n = 17$ Proben, „Doublestrings“: $n = 17$ Proben, „Small Clusters“: $n = 18$ Proben, „Big Clusters“: $n = 18$ Proben, „Diffus“: $n = 16$ Proben).

		„Doublestrings“	„Small Clusters“	„Big Clusters“	„Diffus“
Col1A2	„Strings“				p<0,05
	„Doublestrings“				
	„Small Clusters“				
	„Big Clusters“				
Col2A1	„Strings“				
	„Doublestrings“				
	„Small Clusters“				
	„Big Clusters“				
Col3A1	„Strings“				
	„Doublestrings“				
	„Small Clusters“				
	„Big Clusters“				
Col6A1	„Strings“				
	„Doublestrings“				
	„Small Clusters“				
	„Big Clusters“				

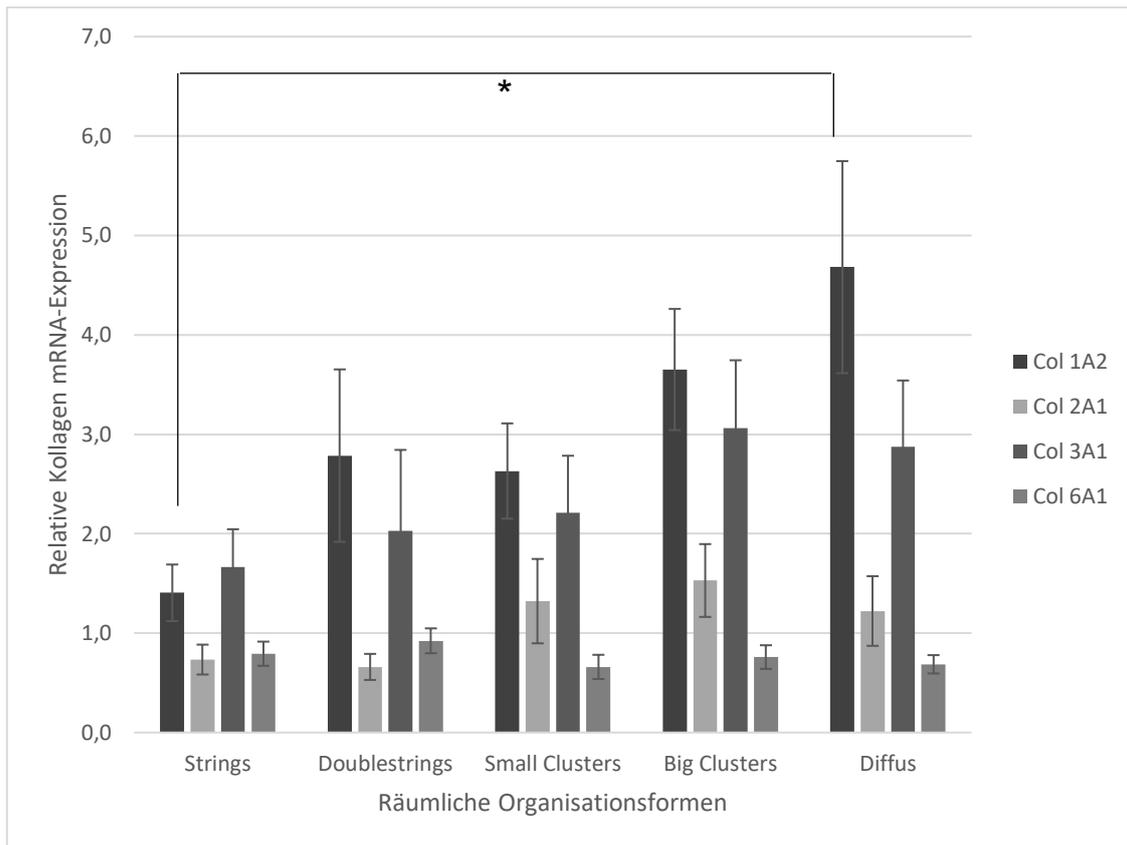


Abb. 51 Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen isolierter superfizieller Chondrozyten („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittlichen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR. Die mit Sternchen markierte Linie kennzeichnet signifikante Expressionsänderungen innerhalb eines Kollagentyps, hier zwischen „Strings“ und „Diffus“ beim Kollagentyp 1A2 („Strings“: n= 17 Proben, „Doublestrings“: n= 18 Proben, „Small Clusters“: n= 18 Proben, „Big Clusters“: n= 18 Proben, „Diffus“: n= 16 Proben).

Zusammenfassend wurde erarbeitet, dass die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression isolierter, superfizieller Chondrozyten von der räumlichen Organisationsform „Strings“ zu den diffus organisierten Chondrozyten signifikant zunahm. Zeitgleich blieben alle anderen Vergleiche der relativen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten verschiedener räumlicher Organisationsformen in Bezug auf die Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 statistisch unverändert.

Ergebnisse

Betrachtete man die Übergänge der räumlichen Organisationsformen der superfiziellen Chondrozyten als einen fortlaufenden, dynamischen Krankheitsprozess, so imponierte die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression über eine signifikant positive Spearman-Rank-Korrelation. Dies bedeutete, dass die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen hinweg (von „Strings“, über „Clusters“ zu „Diffus“) signifikant anstieg (s. Tabelle 25). Die mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1, 3A1 und 6A1 der superfiziellen Chondrozyten wiesen über die räumlichen Organisationsformen hinweg keine signifikanten Spearman-Rank-Korrelationen auf.

Tabelle 25 Spearman-Rank-Order-Korrelation der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1 und 6A1) isolierter, superfizieller Chondrozyten. Die Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Kollagentypen und die dazugehörigen p-Werte wurden anhand des Spearman-Rank-Tests ermittelt. Hierfür war es notwendig die räumlichen Organisationsformen isolierter superfizieller Chondrozyten mit absoluten Zahlen zu kodieren („Strings“= 1, „Doublestrings“= 2, „Small Clusters“= 3, „Big Clusters“= 4, „Diffus“= 5). Ein positiver Korrelationskoeffizient weist auf einen linearen Anstieg der jeweiligen Kollagenexpression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen von „Strings“ bis zur diffus organisierten Anordnung hin. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben (Col1A2: n= 17 Proben, Col2A1 n= 17 Proben, Col3A1: n= 17 Proben, Col6A1: n= 17 Proben).

Kollagentyp		Korrelationskoeffizient K und Signifikanzwert p in Bezug auf die aufsteigend kodierte räumliche Organisationsform
Col1A2	K	0,395
	p	<0,001
Col2A1	K	0,14
	p	0,195
Col3A1	K	0,202
	p	0,06
Col6A1	K	-0,092
	p	0,397

3.2.2 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen von isolierten, superfiziellen Chondrozyten innerhalb der ursprünglichen räumlichen Organisationsformen

Für die Analyse des phänotypischen Genexpressionsprofils isolierter superfizieller Chondrozyten im Zuge einer OA-Erkrankung erfolgte ein paarweiser Vergleich der relativen mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 innerhalb der einzelnen räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und diffus organisierte Chondrozyten. Das Ziel war es hierdurch differenzierte Aussagen über das Genexpressionsverhalten der Chondrozyten in den verschiedenen Stadien einer OA zu erhalten. In diesem Kapitel wurde das Genexpressionsprofil der Chondrozyten betrachtet, welche nach der räumlichen Klassifizierung direkt enzymatisch isoliert und anschließend ohne weitere manipulierende Zwischenschritte analysiert wurden (im Gegensatz zu den Chondrozyten in Kapitel 3.2.3).

Die relative mRNA-Expression der isolierten, superfiziellen Chondrozyten blieb innerhalb der räumlichen Organisationsformen „Strings“ und „Doublestrings“ in Bezug auf alle vier Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1 und 6A1) statistisch unverändert (s. Tabelle 26 und Abb. 52).

Ergebnisse

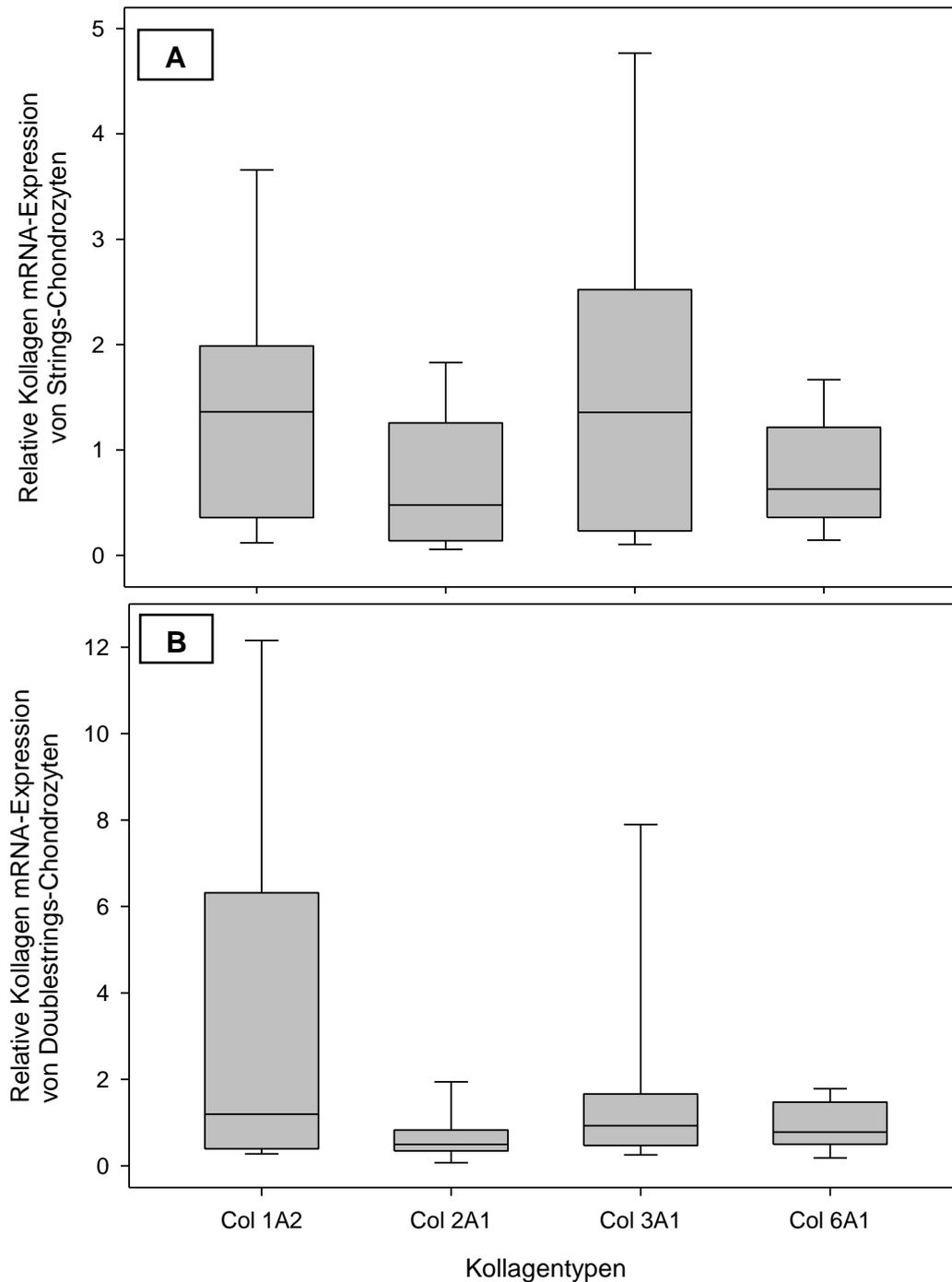


Abb. 52 Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den räumlichen Organisationsformen „Strings“ (A) und „Doublestrings“ (B). Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. (Col1A2: n= 17 Proben, Col2A1 n= 17 Proben, Col3A1: n= 17 Proben, Col6A1: n= 17 Proben).

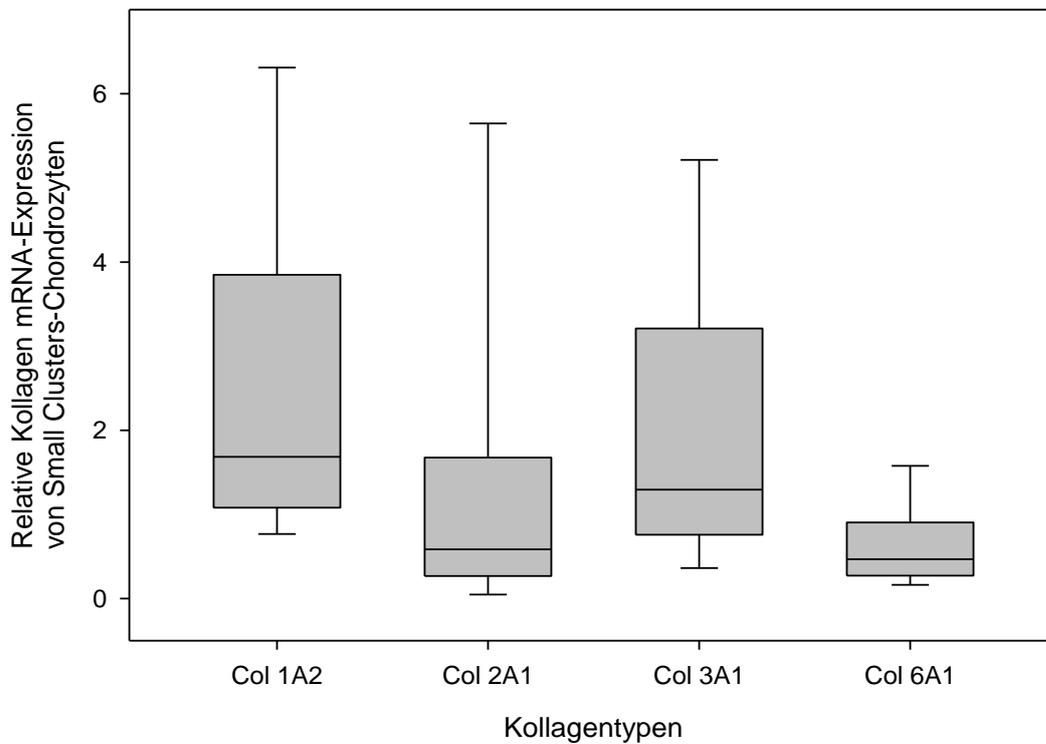


Abb. 53 Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile (Col1A2: n= 18 Proben, Col2A1: n= 18 Proben, Col3A1: n= 18 Proben, Col6A1: n= 18 Proben).

Im Gegensatz dazu nahm die relative mRNA-Expression der isolierten, superfiziellen Chondrozyten in Bezug auf die räumliche Organisationsform „Small Clusters“ von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 bzw. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Hierbei wurde der Kollagentyp 1A2 durchschnittlich 2-fach höher als der Kollagentyp 2A1 und 4-fach höher als der Kollagentyp 6A1 exprimiert. Weiterhin nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 3A1 vs. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Dabei exprimierten die Chondrozyten durchschnittlich 3,4-fach mehr Kollagentyp 3A1 als Kollagentyp 6A1. Vergleiche anderer Konstellationen blieben statistisch unverändert (s. Tabelle 26).

Ergebnisse

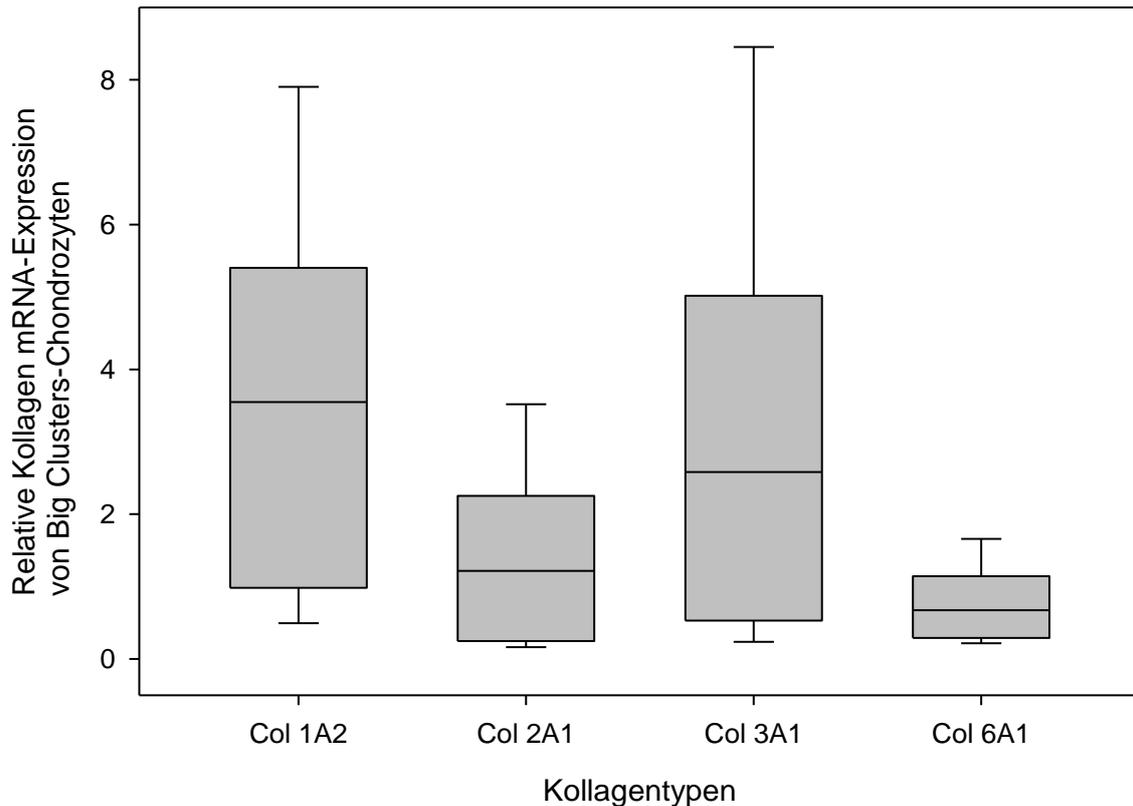


Abb. 54 Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform „Big Clusters“. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile (Col1A2: n= 18 Proben, Col2A1: n= 18 Proben, Col3A1: n= 18 Proben, Col6A1: n= 18 Proben).

Ebenso nahm die relative mRNA-Expression der isolierten, superfiziellen Chondrozyten in Bezug auf die räumliche Organisationsform „Big Clusters“ von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 bzw. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Hierbei wurde der Kollagentyp 1A2 durchschnittlich 2,4-fach höher als Kollagentyp 2A1 und 4,8-fach höher als Kollagentyp 6A1 exprimiert. Weiterhin nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 3A1 vs. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Dabei exprimierten die Chondrozyten durchschnittlich 4-fach mehr Kollagentyp 3A1 als Kollagentyp 6A1. Vergleiche anderer Konstellationen blieben statistisch unverändert (s. Tabelle 26).

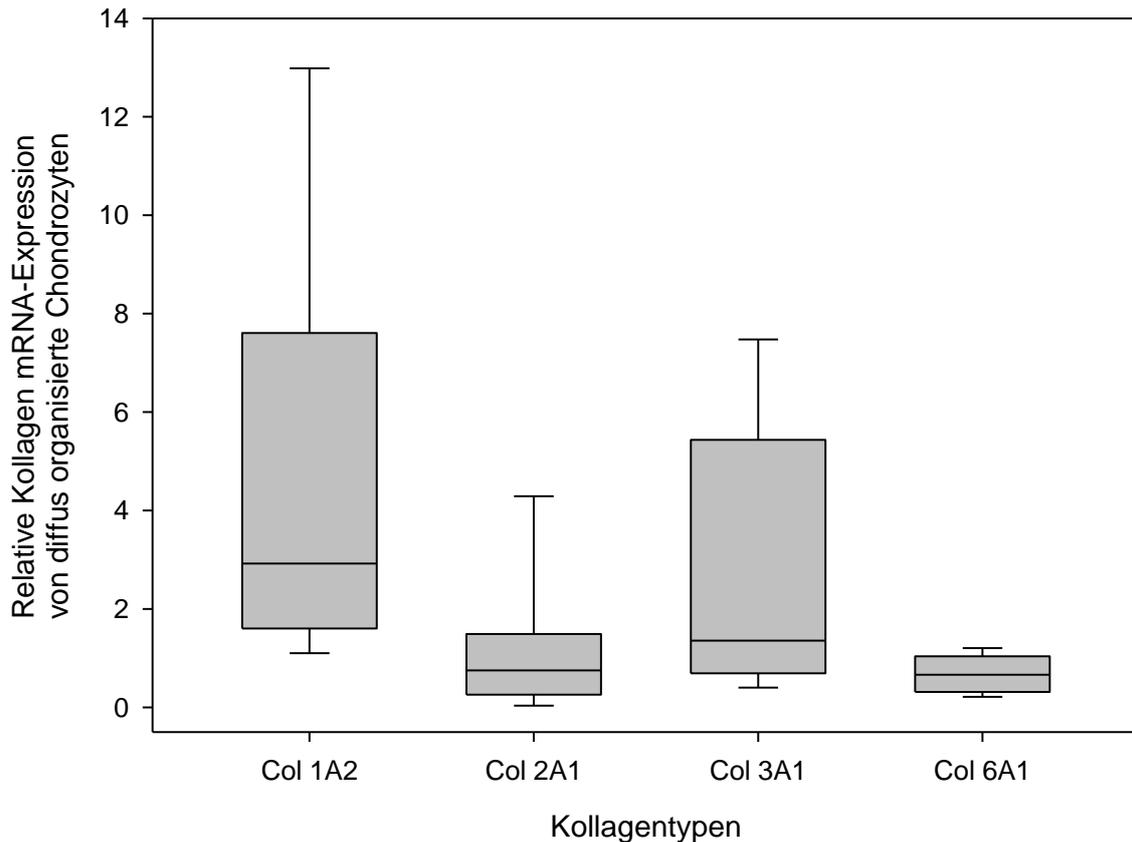


Abb. 55 Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Die Boxplots setzen sich aus dem Median, der 25ten und 75ten Perzentile, sowie den Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile zusammen (Col1A2: n= 16 Proben, Col2A1: n= 16 Proben, Col3A1: n= 16 Proben, Col6A1: n= 16 Proben).

Auch bei den Chondrozyten mit einer diffus organisierten räumlichen Anordnung nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 und Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Hierbei wurde Kollagentyp 1A2 durchschnittlich 3,8-fach höher als Kollagentyp 2A1 und 6,8-fach höher als Kollagentyp 6A1 exprimiert. Weiterhin nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 3A1 vs. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Dabei exprimierten die Chondrozyten durchschnittlich 4,2-fach mehr Kollagentyp 3A1 als Kollagentyp 6A1. Vergleiche andere Konstellationen blieben statistisch unverändert (s. Tabelle 26).

Ergebnisse

Tabelle 26 Statistischer Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den räumlichen Organisationsformen „Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“ und „Diffus“. Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Test (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wurde (Col1A2: $n = 18$ Proben, Col2A1: $n = 18$ Proben, Col3A1: $n = 18$ Proben, Col6A1: $n = 18$ Proben).

		Col2A1	Col3A1	Col6A1
„Strings“	Col1A2			
	Col2A1			
	Col3A1			
„Doublestrings“	Col1A2			
	Col2A1			
	Col3A1			
„Small Clusters“	Col1A2	$p < 0,05$		$p < 0,05$
	Col2A1			
	Col3A1			$p < 0,05$
„Big Clusters“	Col1A2	$p < 0,05$		$p < 0,05$
	Col2A1			
	Col3A1			$p < 0,05$
„Diffus“	Col1A2	$p < 0,05$		$p < 0,05$
	Col2A1			
	Col3A1			$p < 0,05$

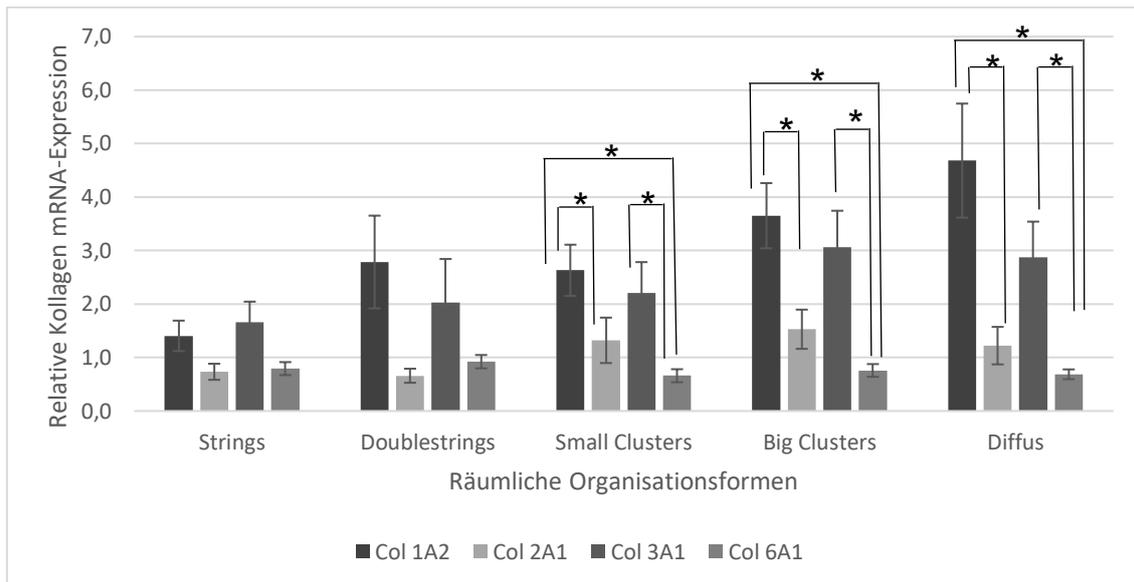


Abb. 56 Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen isolierter superfizieller Chondrozyten („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Balkendiagramme setzen sich aus den durchschnittlichen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardfehler aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR zusammen. Die mit Sternchen markierte Linie kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb eines Kollagentypens, z.B. innerhalb der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“ (Col1A2: n= 18 Proben, Col2A1: n= 18 Proben, Col3A1: n= 18 Proben, Col6A1: n= 18 Proben).

Zusammengefasst blieb die relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen innerhalb der räumlichen Organisationsformen „Strings“ und „Doublestrings“ statistisch unverändert, nahm aber ab der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“ jeweils innerhalb der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“, „Big Clusters“ und diffus organisierten Chondrozyten von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 und 6A1 sowie von Kollagentyp 3A1 vs. Kollagentyp 6A1 signifikant ab.

3.2.3 Relative Kollagen mRNA-Expression isolierter, superfizieller Chondrozyten mit microengineerten Zellgeometrien

In diesem Kapitel wurde, im Gegensatz zu den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2, die Genexpression der Chondrozyten betrachtet, deren Zellgeometrie durch das Aufbringen auf die Mikroadhäsionsflächen von extern geometrisch gesteuert wurden. Ziel war es zu überprüfen, ob durch die Veränderung der Proportionen der superfiziellen Chondrozyten von rundlich („O-Shape“) zu länglich („H-Shape“) das genotypische Profil der Chondrozyten beeinflussbar ist.

Zunächst erfolgte der Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (Col1A2, Col2A1, Col3A1 und Col6A1) der superfiziellen Chondrozyten mit microengineerter Zellgeometrie jeweils innerhalb einer geometrisch-kontrollierten Zellform („H-Shape“, bzw. „O-Shape“):

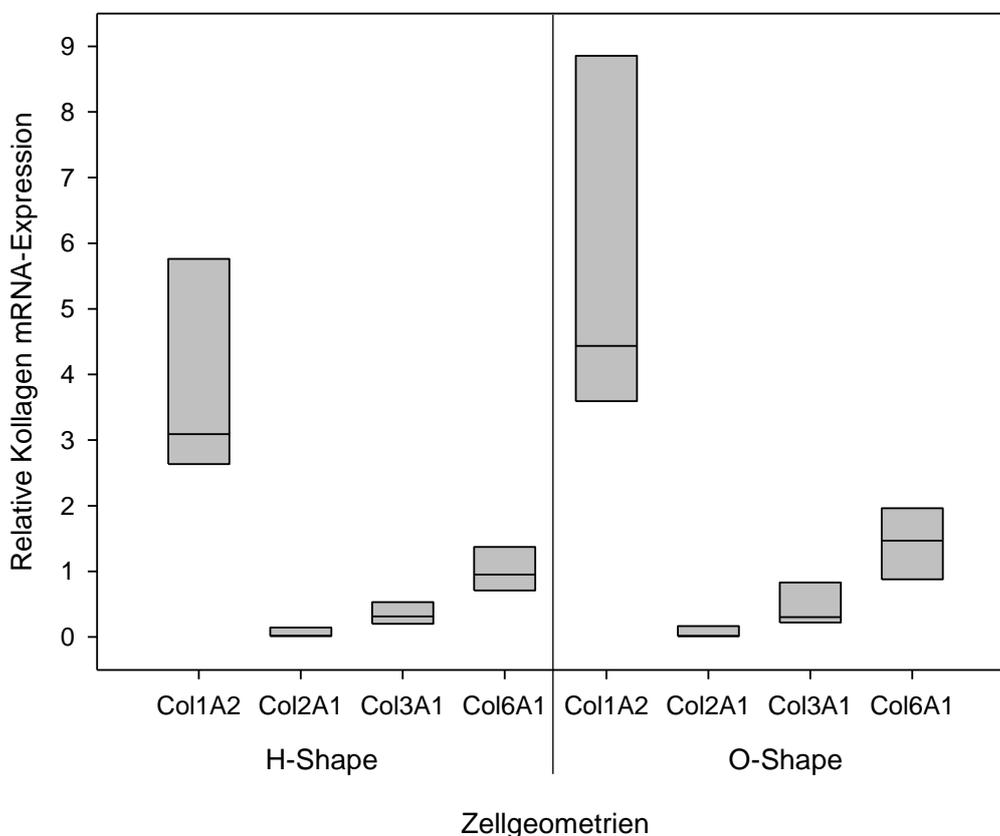


Abb. 57 Boxplot-Diagramm: Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) isolierter, superfizieller Chondrozyten mit der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ und „O-Shape“. Die Boxplots setzen sich aus dem Median, sowie den 25ten und 75ten Perzentilen zusammen. (Col1A2/Col2A1/Col3A1/Col6A1: n= 6).

Hierbei zeigte sich, dass die relative mRNA-Expression der superfiziellen Chondrozyten mit der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ zwischen den Kollagentypen 1A2 und 6A1 statistisch unverändert blieb. Zeitgleich nahm jedoch die relative mRNA-Expression der „H-Shape“-Chondrozyten von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 bzw. 3A1 signifikant ab. Hierbei wurde der Kollagentyp 1A2 durchschnittlich 55-fach mehr als Kollagentyp 2A1, und 12-fach mehr als Kollagentyp 3A1 exprimiert. Weiterhin nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 6A1 vs. Kollagentyp 2A1 signifikant ab. Dabei exprimierten die Chondrozyten durchschnittlich 13-fach mehr Kollagentyp 6A1 als Kollagentyp 2A1.

Auch bei den superfiziellen Chondrozyten, die durch das Aufbringen auf die Fibronektinschablone „O-Shape“ in eine rundliche Form gezwungen wurden, blieb die relative Kollagen mRNA-Expression zwischen den Kollagentypen 1A2 und 6A1 statistisch unverändert, nahm aber von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 bzw. 3A1 signifikant ab. Hierbei wurde der Kollagentyp 1A2 durchschnittlich 66-fach mehr als Kollagentyp 2A1, und 13-fach mehr als Kollagentyp 3A1 exprimiert. Weiterhin nahm die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 6A1 vs. Kollagentyp 2A1 signifikant ab. Dabei exprimierten die Chondrozyten durchschnittlich 19-fach mehr Kollagentyp 6A1 als Kollagentyp 2A1.

Tabelle 27 Statistischer Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) von isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“, bzw. „O-Shape“. Zunächst erfolgte ein ANOVA on Ranks-Test. Bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurden die Daten anschließend anhand eines Post-hoc Test (Dunn) ausgewertet. Signifikante Unterschiede wurden hellgrau kodiert, nicht-signifikante Unterschiede wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, der entsprechende Test wurde in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt (Col1A2/Col2A1/Col3A1/Col6A1: $n = 6$).

		Col2A1	Col3A1	Col6A1
„H-Shape“	Col1A2	p<0,05	p<0,05	
	Col2A1			p<0,05
	Col3A1			
„O-Shape“	Col1A2	p<0,05	p<0,05	
	Col2A1			p<0,05
	Col3A1			

Ergebnisse

Des Weiteren erfolgte der Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (Col1A2, Col2A1, Col3A1, Col6A1) für jeden Kollagentypen zwischen den Chondrozytengruppen mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“:

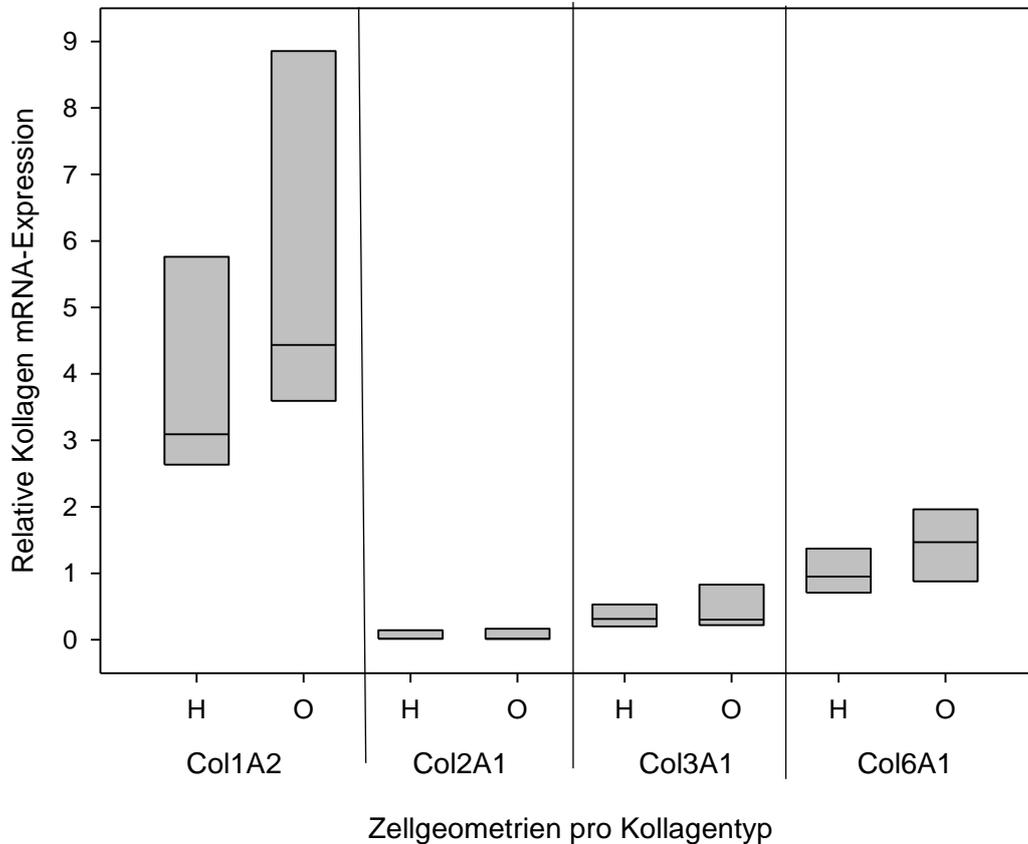


Abb. 58 Boxplot-Diagramm: Vergleich der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) zwischen isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ vs. „O-Shape“. Die Boxplots zeigen den Median, sowie die 25te und 75te Perzentile. (Col1A2/Col2A1/ Col3A1/Col6A1: n= 6 Proben).

Hierbei zeigte sich, dass die relative mRNA-Expression des Kollagentypen 1A2 von den Chondrozyten mit einem „H-Shape“ zu den Chondrozyten mit einem „O-Shape“ signifikant zunahm. Dabei exprimierten die isolierten, superfiziellen Chondrozyten mit der microengineerten Zellgeometrie „H-Shape“ durchschnittlich 1,4-fach weniger Kollagentyp 1A2 als isolierte, superfizielle Chondrozyten mit der microengineerten Zellgeometrie „O-Shape“. D. h. durch die Änderung der Zellgeometrie von rundlich („O-Shape“) nach elliptisch („H-Shape“) konnte

die Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression um durchschnittlich 29,6 % gesenkt werden (s. Tabelle 28).

In der weiteren Analyse zeigte sich zwischen den zwei microengineerten Chondrozytengruppen außerdem ein signifikanter Unterschied in der relativen Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression. Hierbei konnte durch die Veränderung der Zellgeometrie von elliptisch zu rundlich die relative Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression um durchschnittlich -30,9 % gesenkt werden (s. Tabelle 28).

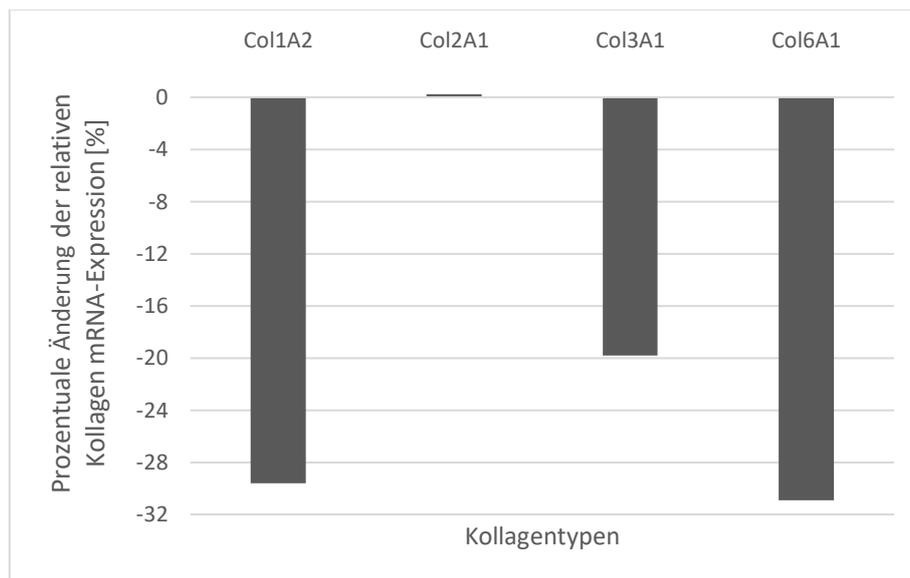


Abb. 59 Balkendiagramm: Prozentuale Änderung der relativen Kollagen mRNA-Expression bei Shape-Korrektur von „O-Shape“ zu „H-Shape“ in Bezug auf verschiedene Kollagentypen. Das Diagramm zeigt die prozentuale Änderung der Kollagen mRNA-Expression für die Kollagentypen Col1A2, Col2A1, Col3A1 und Col6A1. Dabei nimmt die relative Kollagen mRNA-Expression von „O-Shape“ nach „H-Shape“, bis auf den Kollagentyp 2A1, ab.

Tabelle 28 Prozentuale Änderung der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1). Prozentuale Änderung der Kollagenexpressionen zwischen zellgeometrisch-kontrollierten Chondrozyten mit einem „H-“, bzw. „O-Shape“; Prozentuale Änderungen signifikanter Vergleiche wurden hellgrau kodiert.

Prozentuale Änderung der relativen mRNA-Expression auf Mikroadhäsionsflächen im Vergleich von „O-Shape“ zu „H-Shape“	Statistische Veränderung	
Col1A2	-29,6 % = <i>Therapeutischer Effekt der Shape-Korrektur</i>	p<0,05
Col2A1	+0,2 %	n. sign.
Col3A1	-19,8 %	n. sign.
Col6A1	-30,9 %	p<0,05

Ergebnisse

Zusammengefasst wurde erarbeitet, dass innerhalb beider microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“ die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression signifikant unterschiedlich zu den relativen mRNA-Expressionen der Kollagentypen 2A1 und 6A1 war, während gleichzeitig ein signifikanter Unterschied zwischen der relativen mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1 und 6A1 bestand:

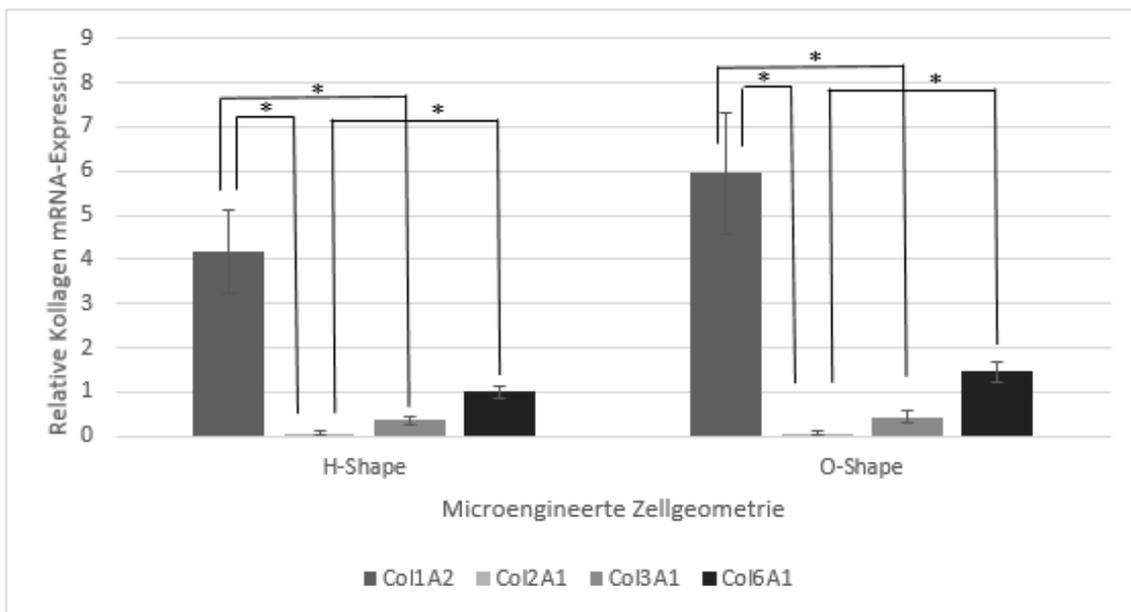


Abb. 60 Balkendiagramm: Durchschnittliche, relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“. Die Balkendiagramme setzen sich aus den durchschnittlichen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardfehlern aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR zusammen. Die mit Sternchen markierten Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“, bzw. „O-Shape“ (Col1A2/ Col2A1/ Col3A1/ Col6A1: n= 6 Proben).

Zeitgleich waren die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression und die relative Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression zwischen den zwei microengineerten Chondrozytengruppen „H-Shape“ bzw. „O-Shape“ signifikant unterschiedlich:

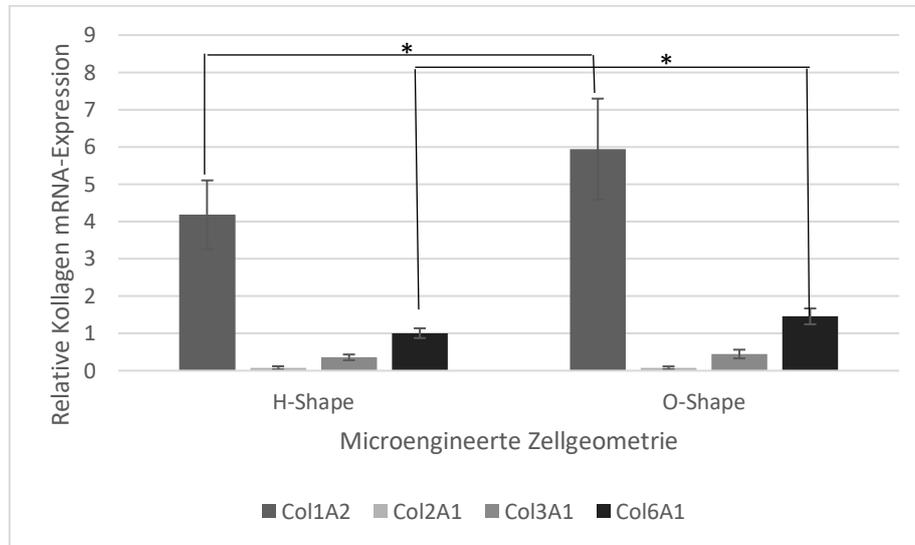


Abb. 61 Balkendiagramm: Durchschnittliche, relative mRNA-Expression der Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 von isolierten superfiziellen Chondrozyten mit den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“. Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittlichen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler aus den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR. Die mit Sternchen markierte Linie kennzeichnet signifikante Unterschiede innerhalb eines Kollagentyps zwischen den microengineerten Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“ (Col1A2/ Col2A1/ Col3A1/ Col6A1: n= 6 Proben).

So führte die Anwendung des „H-Shapes“ im Vergleich zum „O-Shape“ bei den Chondrozyten zu einer 29,6 %-igen Reduktion der Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression und zu einer 30,9 %-igen Reduktion der Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression. Da in diesem Versuch dieselbe Chondrozyten-Populationen simultan auf beiden Mikroadhäsionsflächen untersucht wurden, zeigen diese Daten, dass die Korrektur der Zellgeometrie von einer rundlichen („O-Shape“) zu einer elliptischen („H-Shape“) Morphologie einen signifikanten Effekt auf die Kollagentyp 1A2 und Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression hatte. Da der Vergleich der anderen Kollagentypen (2A1 und 3A1) zwischen den beiden Zellmorphologien nicht signifikant war, stellte die Korrektur der Zellgeometrie eine selektive Korrektur der Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression und der Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression dar.

3.3 Analyse der relativen Kollagen mRNA-Expression im Zusammenhang mit der Ausprägung zellgeometrischer Charakteristika von superfiziellen Chondrozyten

3.3.1 Analyse von superfiziellen Chondrozyten im Gewebe

Um eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen den Genexpressionsprofilen und den zellgeometrischen Charakteristika von superfiziellen Chondrozyten im Gewebe treffen zu können, wurden die Daten bzgl. der Zellgeometrie superfizieller, nicht isolierter Chondrozyten (Kapitel 3.1.1) mit dem phänotypischen Genexpressionsprofil der superfiziellen, nicht isolierten Chondrozyten parallel betrachtet. Da in der vorliegenden Dissertation nur das Genexpressionsprofil enzymatisch isolierter Chondrozyten analysiert wurde und die zusätzliche Genexpressionsanalyse der Chondrozyten im Gewebe den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, wurde im folgenden Vergleich auf die Genexpressionsdaten aus J. Schröders Inaugural-Dissertation („Kollagen Typ I, II, III und VI - mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen humaner Chondrozyten“) mit dessen freundlicher Genehmigung zurückgegriffen (Schröder, 2017).

Da die Proportionen der Zellgeometrie (gemessen anhand von Shape Deskriptoren, hier repräsentativ Aspect Ratio und Roundness) und die Höhe der relativen Kollagen mRNA-Expression (hier repräsentativ Kollagentyp 1A2) mit unterschiedlichen Parametern gemessen wurden, war keine direktvergleichende statistische Analyse der Daten möglich. Daher wurde für jeden zu untersuchenden Parameter eine separate Spearman-Rank-Order-Korrelation durchgeführt, um dann anhand des Vergleichs der jeweiligen Korrelationen mögliche gemeinsame Tendenzen im Zuge der OA beurteilen zu können:

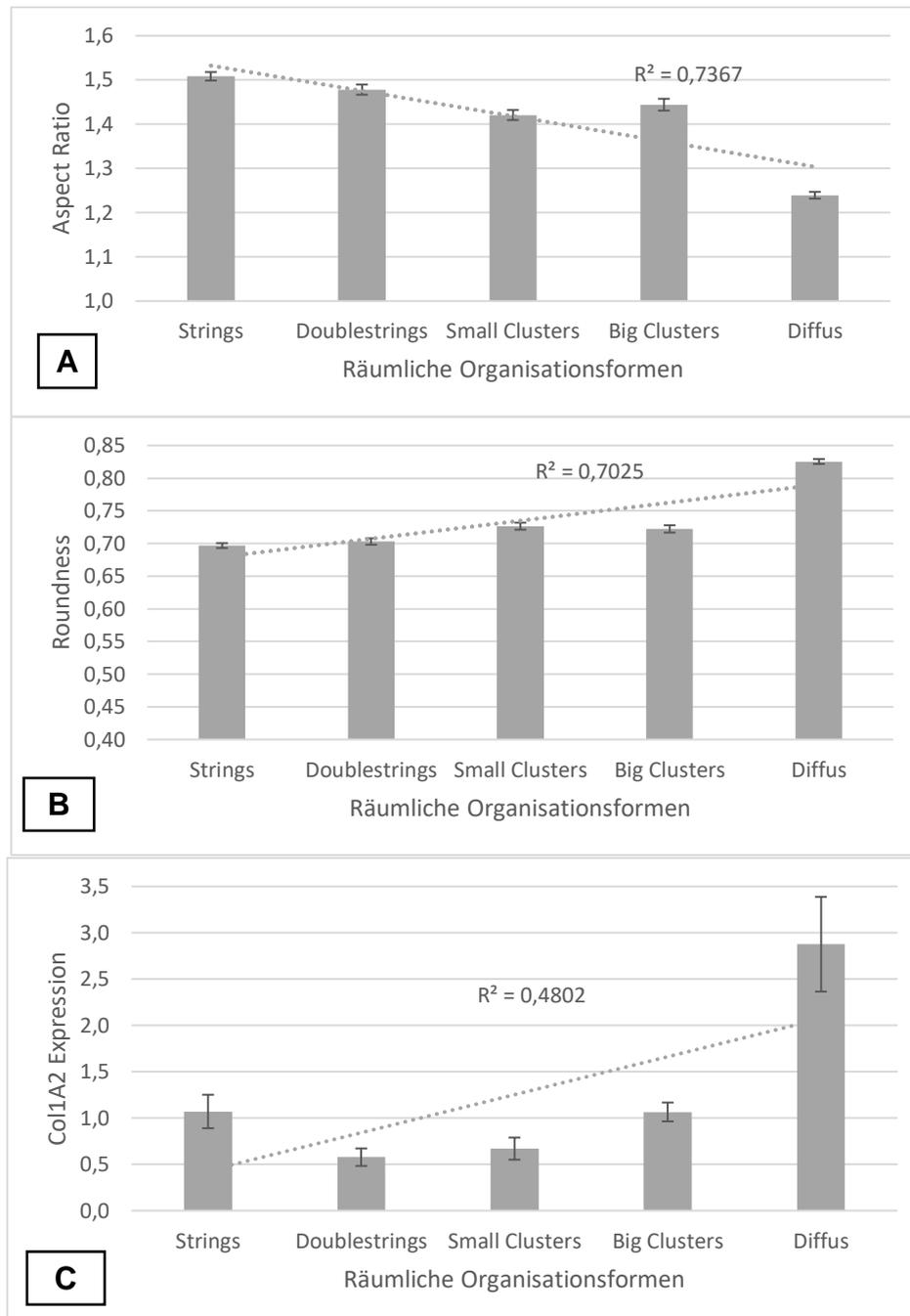


Abb. 62 Balkendiagramme: Gemeinsame Darstellung der zellgeometrischen Charakteristika und der Genexpressionsprofile superfizieller Chondrozyten in Abhängigkeit ihrer räumlichen Organisationsform. Die Balkendiagramme setzen sich aus den jeweiligen Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern zusammen. Die gestrichelte Trendlinie ist zur besseren Übersicht eingezeichnet. Die räumlichen Organisationsformen der superfiziellen Chondrozyten („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) wurden gegen die zellgeometrischen Charakteristika (Aspect Ratio, Roundness), oder gegen die relative Kollagentyp 1A2-mRNA-Expression aufgezeichnet. **A+B:** Shape Deskriptoren (**A:** Aspect Ratio, **B:** Roundness: „Strings“: n= 1481, „Doublestrings“: n= 728, „Small Clusters“: n= 549, „Big Clusters“: n= 597, „Diffus“: n= 839) **C:** Relative Kollagentyp 1A2-mRNA-Expressionsprofile von

Ergebnisse

Chondrozyten im Gewebe („Strings“: n= 9, „Doublestrings“: n= 12, „Small Clusters“: n= 11, „Big Clusters“: n= 11; „Diffus“: n= 12).

Betrachtete man die räumlichen Organisationsformen von „Strings“ in Richtung „Diffus“ als einen fortlaufenden Prozess, so zeigten der Shape Deskriptor Roundness und die relative Kollagentyp 1A2 eine signifikant positive Spearman-Rank-Korrelation, d. h. die zwei Parameter stiegen über alle räumlichen Organisationsformen hinweg an. Der Shape Deskriptor AR zeigte eine signifikant negative Spearman-Rank-Korrelation, d. h. der AR nahm über alle räumlichen Organisationsformen hinweg ab. Eine Zunahme der Round bzw. eine Abnahme des AR bedeuteten, dass die Chondrozyten bei „Strings“ eine längliche Struktur aufwiesen und bei diffus organisierten Chondrozyten am meisten abgerundet waren. Die ellipsoide Form der „String“-Chondrozyten wurde in diffus organisierte Chondrozyten also durch eine runde Form ersetzt. Ein abnehmender AR bzw. eine zunehmende Roundness war hierbei mit einer zunehmenden Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression assoziiert.

Tabelle 29 Korrelation der Ausprägung zellgeometrischer Charakteristika (Aspect Ratio, Roundness), bzw. der relativen Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression mit den superfiziellen räumlichen Organisationsformen in aufsteigender Reihenfolge („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte wurden anhand des Spearman-Rank-Order-Tests ermittelt. Für die Spearman-Korrelation war es notwendig, die räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten mit absoluten Zahlen zu kodieren („Strings“= 1; „Doublestrings“= 2, „Small Clusters“= 3, „Big Clusters“= 4, „Diffus“= 5). Ein positiver Korrelationskoeffizient weist auf einen linearen Anstieg in der Ausprägung des jeweiligen Shape Deskriptors in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen von „Strings“ bis zur diffus organisierten Verteilung hin. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben.

Räumliche Organisationsformen vs.:		Korrelationskoeffizient K und Signifikanzwert p
Aspect Ratio	K	-0,298
	p	<0,001
Roundness	K	0,298
	p	<0,001
Col1A2	K	0,405
	p	<0,001

3.3.2 Analyse von superfiziellen, isolierten Chondrozyten mit geometrisch-kontrollierter Zellmorphologie

Im Folgenden wurde untersucht, ob zwischen der extern-kontrollierten Zellgeometrie isolierter Chondrozyten, hier repräsentiert durch die Shape Deskriptoren Aspect Ratio und Roundness und dem vorherrschenden Genexpressionsprofil nach dem Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen, hier repräsentiert durch Kollagentyp 1A2, ein Zusammenhang besteht. In dieser Analyse konnte, im Gegensatz zu Kapitel 3.3.1, der direkte Vergleich der gleichen Chondrozytenproben aus dieser Dissertation erfolgen.

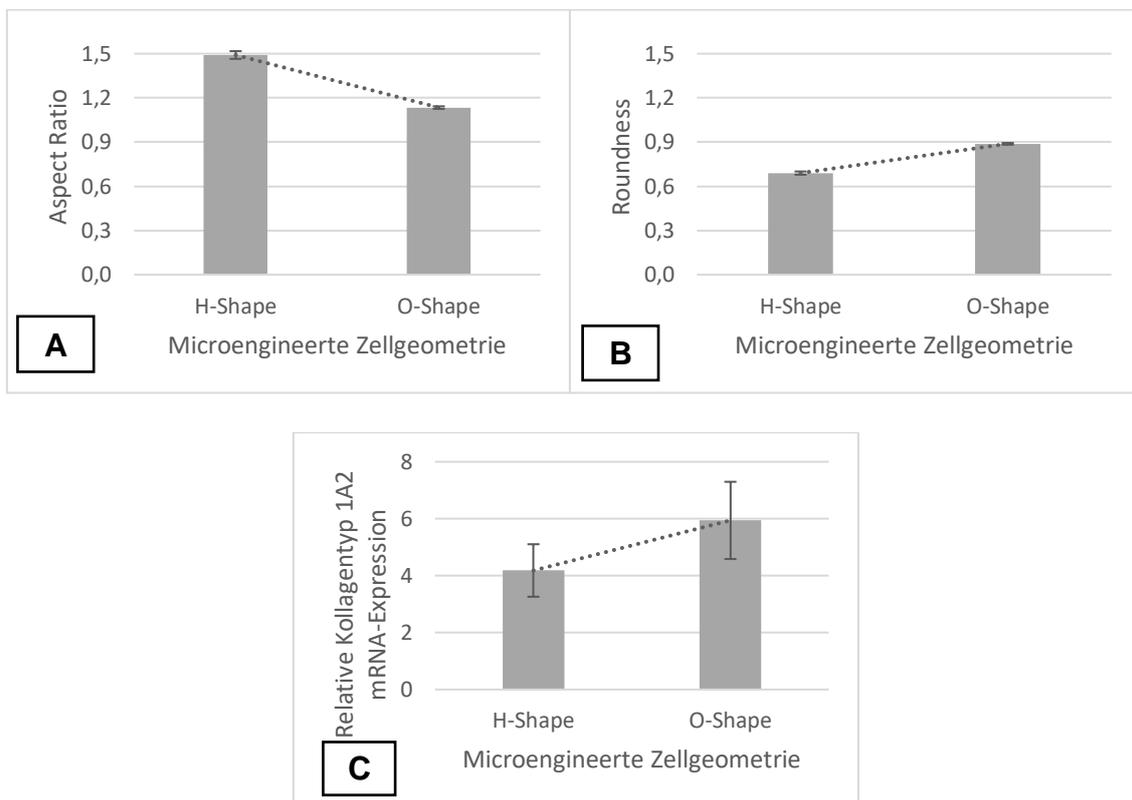


Abb. 63 Balkendiagramme: Gemeinsame Darstellung der zellgeometrischen Charakteristika und der Genexpressionsprofile superfizieller isolierter Chondrozyten mit geometrisch-kontrollierter Zellform. Die Balkendiagramme setzen sich aus den jeweiligen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardfehlern zusammen. Die definierten Zellgeometrien der superfiziellen Chondrozyten („H-Shape“, „O-Shape“) wurden gegen die zellgeometrischen Charakteristika (Aspect Ratio (**A**), Roundness (**B**)), oder gegen die relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression (**C**) aufgezeichnet. A+B: Shape Deskriptoren („H-Shape“: n= 100; „O-Shape“: n= 146) C: Relative Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression („H-Shape“: n= 6; „O-Shape“: n= 6).

Ergebnisse

Da es sich bei der relativen Kollagen mRNA-Expression und den zellgeometrischen Charakteristika um zwei verschiedene Messgrößen handelte, wurde zunächst für jede Messgröße (Aspect Ratio, Roundness, Col1A2, Col6A1) der paarweise Vergleich „H-Shape“ vs. „O-Shape“ durchgeführt. Hierbei unterschieden sich die Chondrozyten mit der manipulierten Zellgeometrie „H-Shape“ in allen Vergleichen signifikant von den Chondrozyten mit der manipulierten Zellgeometrie „O-Shape“. Dies deckte sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.3.

Somit konnte gesagt werden, dass das Cytoo-Chip-Modell die in vivo-Situation im Gewebe sehr gut nachstellte. Auch wenn die Werte nicht direkt vergleichbar waren, ließ sich anhand der Trendlinien erkennen, dass sowohl im Gewebe als auch im in-vitro-Modell die Veränderung der Zellform von rund nach elliptisch mit einem Abfall der Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression einherging.

In der Höhe der Genexpression zeigten sich im Vergleich der relativen Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression im Gewebe und im in-vitro-Modell noch deutlichere Unterschiede. So exprimierten diffus organisierte Chondrozyten im Gewebe 2,3-fach mehr Kollagentyp 1A2 als Chondrozyten der „Strings“-Formation. D. h. theoretisch muss die Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression um 56,9 % gesenkt werden, um den erkrankten „diffus“ organisierten Zustand der Chondrozyten in ein gesundes Stadium mit einer „Strings“-Formation zu überführen. Im in-vitro-Modellsystem gelang eine Reduktion der Kollagentyp 1A um 29,6 %. Das hier erstellte Modell nähert sich den in-vivo-Bedingungen also bis auf 27,3 % genau an, traf diese jedoch noch nicht exakt.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten aus hyalinem Kniegelenksknorpel

4.1.1 Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten in situ im hyalinen Kniegelenksknorpel

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten in verschiedenen Stadien der Osteoarthrose-Erkrankung aus humanen Kniegelenkskondylen zu analysieren und herauszufinden, ob Unterschiede zwischen der Zellmorphologie gesunder bzw. erkrankter Chondrozyten detektierbar waren. Hierfür wurde „gesund“ vs. „krank“ auf zwei Ebenen definiert: Zum einen wurden die Stadien anhand der räumlichen Anordnungen von superfiziellen Chondrozyten im Gewebe nach Rolauffs verwendet (Rolauffs et al., 2008). Rolauffs definierte gesunde Chondrozyten über die räumliche Anordnung in einer „Strings“-Formation, die über die Zwischenstadien „Doublestrings“, „Small Clusters“ und „Big Clusters“ in das Endstadium der erkrankten, diffus organisierten Chondrozyten übergehen. Weiterhin wurde der Zustand „gesund“ über die Zellmorphologie definiert. Die Zellmorphologie von „normalen“, gesunden Chondrozyten der superfiziellen Zone wurden in der Literatur bereits sehr häufig beschrieben. Hierbei handelt es sich um Chondrozyten mit einer ellipsoiden, länglichen Zellmorphologie (Murray et al., 2010, Jadin et al., 2005, Poole et al., 1992, Hunziker, 1992). Der Zellmorphologie OA-erkrankter in situ-Chondrozyten im Endstadium wurde bis jetzt keine Aufmerksamkeit geschenkt, da in vielen Arbeiten die Chondrozyten nicht in situ, sondern in Kulturen betrachtet wurden. So wurden in dieser Arbeit erstmals die zellmorphologischen Eigenschaften erkrankter superfizieller Chondrozyten im Gewebe beschrieben. Das erkrankte Stadium wurde über die räumliche Organisationsform „Diffus“ der Chondrozyten definiert (Rolauffs et al., 2008).

Die Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten wurde in dieser Arbeit anhand von vier quantitativen Shape Deskriptoren analysiert (Aspect Ratio (AR), Roundness (Round), Circularity (Circ), Solidity (Sol)). Hierbei zeigte sich, dass in allen vier untersuchten Parametern die niedrigsten bzw. höchsten Werte in

Diskussion

Chondrozyten mit einer „Strings“-Formation oder in diffus angeordneten Chondrozyten zu finden waren. So wurde erarbeitet, dass „Strings“-Chondrozyten eine elliptische Zellgeometrie mit Charakteristika typisch für viele Membranprotrusionen und somit den höchsten Aspect Ratio, die niedrigste Roundness, die niedrigste Circularity und die niedrigste Solidity aller Organisationsformen aufwiesen. Chondrozyten in einer diffusen räumlichen Anordnung waren in allen Parametern signifikant anders und wiesen eine rundliche Zellgeometrie mit Charakteristika typisch für wenige Membranprotrusionen und somit den niedrigsten Aspect Ratio, die höchste Roundness, die höchste Circularity und die höchste Solidity aller Organisationsformen auf. Zusammengefasst hatten „Strings“-Chondrozyten eine längliche Zellform, während diffus organisierte Chondrozyten eine rundliche Zellform aufwiesen. Übertragen auf den Gesundheitsstatus der Chondrozyten bestätigten sich die bisherigen Ergebnisse, dass gesunde superfizielle Chondrozyten eine längliche Zellmorphologie aufweisen (Murray et al., 2010, Jadin et al., 2005, Poole et al., 1992, Hunziker, 1992). Dieses Wissen konnte nun erstmals um die Erkenntnis erweitert werden, dass erkrankte superfizielle Chondrozyten in situ eine rundliche Zellmorphologie besitzen.

Die statistisch signifikanten Unterschiede der superfiziellen Chondrozyten zwischen diffus organisierten Chondrozyten und den Chondrozyten der anderen räumlichen Organisationsformen zeigten, dass es sich bei den kontinuierlichen Veränderungen der Zellmorphologie um einen dynamischen Prozess handelt, der jedoch nicht linear war, da es v. a. zu Beginn („Strings“) und gegen Ende („Diffus“) zu signifikanten Sprüngen in den Daten zur Organisation kam. Dies bedeutete, dass bereits zu Beginn einer OA-Erkrankung große Veränderungen innerhalb des Knorpelgewebes stattfinden (Felka et al., 2016), weswegen eine frühe Detektion des krankhaften Umbaus von großem Vorteil wäre, um weitere Knorpelschäden zu verhindern.

Bei der Betrachtung der einzelnen Shape Deskriptoren zeigte sich, dass die Zellform der Chondrozyten sich in Bezug auf den Parameter Roundness von „Strings“ zu „Diffus“, von gesund zu krank, mit durchschnittlich 22,0 % am stärksten veränderte. Das bedeutete, dass die diffus organisierten Chondrozyten um ein Fünftel runder waren als „Strings“-Chondrozyten. Zeitgleich blieb die

Zellform in Bezug auf die Solidity, also auf die Anzahl der Ein- und Ausbuchtungen, mit einer Veränderung von nur 1,5 % relativ unverändert. Dies bedeutete, dass die Chondrozyten im Krankheitsprozess in situ stärker das Seitenverhältnis ihrer Morphologie, als ihre Protrusionen veränderten. Hierbei waren die Veränderungen der zellgeometrischen Charakteristika in Bezug auf alle vier Shape Deskriptoren signifikant.

Zusammengefasst ließen diese Ergebnisse also den Rückschluss zu, dass die Zellmorphologien der Kniegelenks-Chondrozyten in den beschriebenen räumlichen Organisationsformen verschiedene Stadien einer OA-Pathogenese mit dynamischen Übergängen darstellen. Weiterhin fanden die morphometrischen Hauptveränderungen zu Beginn des Krankheitsverlaufs, also bereits bei den ersten Veränderungen der räumlichen Organisation, und am Ende bei absolut diffuser Anordnung der Chondrozyten statt. Dies bedeutet, dass bereits im intakten Knorpel in der Nähe von präklinischen Knorpelschäden relevante Veränderungen der superfiziellen Chondrozytenmorphologien in Erscheinung treten, bevor makroskopische oder klinische Symptome auftreten (Rolauffs et al., 2010). Somit stellen die Veränderungen der Chondrozytenmorphologie möglicherweise mit einer der ersten pathologischen Knorpelveränderungen im Zuge einer OA-Erkrankung dar.

Rolauffs zeigte, dass superfizielle Chondrozyten, welche sich im intaktem Knorpelgewebe in der Nähe zu einer OA-Läsion befinden, bereits durch den Einfluss der benachbart liegenden OA ihre räumliche Organisationsform ändern und von „Strings“ in „Doublestrings“ übergehen (Rolauffs et al., 2010, Rolauffs et al., 2011). Er beschrieb, dass der Remodellierungsprozess der superfiziellen Chondrozyten in „Doublestrings“ mit einer erhöhten Zellanzahl pro Zellgruppe, sowie einer erhöhten Zelldichte in der superfiziellen Zone, in welcher der Umbauprozess stattfindet, einherging. Dies deutete darauf hin, dass der Umbauprozess auf einer gesteigerten Proliferation beruht, was in Felka et al experimentell reproduziert wurde (Felka et al., 2016). Hierzu standen diese Veränderungen direkt in der OA-Läsion in starkem Kontrast, da sich die hier befindlichen Chondrozyten keiner räumlichen Organisation mehr zuordnen ließen (Rolauffs et al., 2011). Die in dieser Arbeit aufgeführten Beobachtungen bzgl. der Verän-

derungen der Zellmorphologie von superfiziellen Chondrozyten im Zuge einer OA-Erkrankung bestätigten die Ergebnisse von Rolauffs und erweiterten diese um die Erkenntnis, dass die Chondrozyten bei dem Umbauprozess nicht nur ihre räumliche Anordnung ändern, sondern im gleichen Zuge ihre Zellmorphologie den veränderten Bedingungen signifikant anpassen, indem die Morphologie von einer länglichen Zellgeometrie mit vielen Membranprotrusionen in eine rundlichere Morphologie mit weniger Membranprotrusionen überging.

Weiterhin wurde beobachtet, dass zwischen den chronologisch ersten räumlichen Raumordnungen „Strings“ und „Doublestrings“ die Zellmorphologien der superfiziellen Chondrozyten nicht signifikant unterschiedlich waren. Eine ähnliche Beobachtung auf dem Level der Organisation machte bereits Felka: Er beschrieb, dass sich alle räumlichen Organisationsformen, bis auf „Strings“ und „Doublestrings“, bzgl. ihres Levels der Gruppierung, also der spezifischen Anordnung im Raum, signifikant unterscheiden (Felka et al., 2016). Somit konnte Felkas Aussage insofern ergänzt werden, dass sich die Chondrozyten im Zuge der OA nicht nur räumlich, sondern auch zellmorphologisch umsortieren, was jedoch v. a. ab den Cluster-Formationen zum Ausdruck kommt.

Da die Veränderungen der Chondrozytenmorphologie einen ersten Hinweis auf beginnende osteoarthrotische Veränderungen liefern, könnten diese bei Untersuchungen des Kniegelenks als diagnostisches Mittel eingesetzt werden, um hierdurch Frühstadien der OA zu entdecken, bevor eine manifeste OA bleibende Gelenkschäden verursacht. Denselben Vorschlag erörterte Rolauffs bereits in Bezug auf das Auftreten von „Doublestrings“ in makroskopisch intaktem Knorpel in der Nähe von fokalen OA-Läsionen (Rolauffs et al., 2011). Dieser analytische Schritt könnte durch die zusätzliche Analyse der Zellmorphologien erweitert werden. Diese Überlegungen befinden sich aktuell jedoch noch im theoretischen Stadium, da die nötigen medizintechnischen Umsetzungen für die praktische, klinische Anwendung noch erfolgen müssen. So wäre es an sich möglich mit Hilfe eines Multiphotonenmikroskops lebendes Gewebe (nicht gefärbt, nicht gestanzt) darzustellen. Diese Herangehensweise ist jedoch noch nicht im klinischen Alltag etabliert, da man hierfür einen Teilchenbeschleuniger benötigen würde (Angele et al., 2016). Dennoch lässt sich der Ausblick wagen,

dass in Zukunft eine frühe OA-Diagnostik auf zellulärer Ebene möglich und zukunftsrelevant ist, da hierdurch eine spätere, manifeste OA verhindert bzw. verzögert werden könnte und beim Einsatz von Multiphotonenmikroskopen dem Patient kein zusätzlicher Gewebeschaden für die Probengewinnung zugefügt werden müsste (Aicher and Rolauffs, 2014, Novakofski et al., 2014). Hierbei ist jedoch verstärkt die räumliche Organisationsform der Chondrozyten relevant, da „Strings“ und „Doublestrings“ klar voneinander abgrenzbar sind (Rolauffs et al., 2010), während die Zellmorphologie von superfiziellen Chondrozyten in „Strings“ bzw. in „Doublestrings“ keinen signifikanten Unterschied aufwies. Für die Unterscheidung der frühen vs. der späten Osteoarthritis könnte die Analyse der morphometrischen Eigenschaften der Chondrozyten jedoch eine sinnvolle Erweiterung der Diagnostik darstellen. Diese technische Weiterentwicklung wäre v. a. für jüngere Patienten mit sportbedingten Knorpeldefekten, sowie Trauma-Patienten mit intraartikulären Frakturen, die hierdurch ein hohes Risiko für posttraumatische OA haben, von Bedeutung (Aicher and Rolauffs, 2014). Eine weitere, noch im experimentellen Status befindliche Diagnostikmethode stellt die quantitative intraartikuläre Ultraschalltechnik dar, mit der Rauigkeiten auf der Knorpeloberfläche (Virén et al., 2009) und damit mögliche spätere OA-Läsionen detektiert werden (Nishitani et al., 2014). Auch das „Laser Scanning Confocal Arthroscope“ stellt eine nicht-destruktive intraoperative Methode zur Determinierung eines möglichen OA-Schadens dar (Jones et al., 2004) Ob diese Methoden sich im Vergleich zur diagnostischen Morphometrie bzw. der Organisationsanalyse durchsetzen werden, bleibt abzuwarten.

Weiterhin sollte über eine neue OA-Klassifikation nachgedacht werden, welche v. a. die frühe OA besser erfasst, da sowohl die Klassifikation des „American College of Rheumatology“ (ACR) von 1986 (Altman et al., 1986) als auch die Klassifikation der „European League against Rheumatism“ (EULAR) von 2010 (Zhang et al., 2009) keine Kriterien zur Früherkennung bieten (Favero et al., 2015). Dies rührt daher, dass sich beide Klassifikationen bei der Beurteilung der OA nur auf Symptome, Alter und Klinik des Patienten, sowie auf radiologische Kriterien stützen (Favero et al., 2015). Deswegen würde die Analyse der superfiziellen räumlichen Organisationsformen der Chondrozyten, sowie die Analyse

ihrer Zellmorphologie einen großen diagnostischen Fortschritt bei Risikopatienten darstellen (Rolauffs et al., 2011).

Retrospektiv weist die Auswertung der Zellmorphologie mit der Software ImageJ fehleranalytisch Verbesserungspotential in Bezug auf die Userabhängigkeit der Methode auf. So wurden die zu analysierenden Chondrozyten mit dem Plug-In „Cell Magic Wand Tool“ manuell ausgewählt, was den subjektiven Einfluss bei der Auswahl der Chondrozyten nicht vollständig unterbindet. Eine automatische Erkennung der Chondrozyten war jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden technisch nicht möglich. Die, in unserem Labor etablierte, vollautomatische Methode zur Analyse von MSCs und Biomaterialien wurde zwar an den Knorpeldiscs zur Auswertung der Chondrozytenmorphologie getestet, war aber auf Grund verschiedener Ausgangsbedingungen (z. B. Dicke und Kontrast des Präparats, Gewebe vs. Kultur) nicht auf die Knorpeldiscs übertragbar. Für die Zukunft wäre ein „Machine Learning“-Programm denkbar, welches anhand definierter „Lernshapes“ die Zellmorphologien der Chondrozyten kennenlernt und diese anschließend zur automatischen Zellerkennung verwendet. Weitere Möglichkeiten wäre das Anfertigen dünnerer Knorpelschnitte (hier: 300 μm) und das Anfertigen von 3D-Z-Stacks und deren anschließenden aufwendigen Rekonstruktion (hier: Einzelbild-Snapshots). Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellte der entstehende Lerneffekt bei der Beurteilung der Bilder dar. Dieser wurde vor der endgültigen Analyse berücksichtigt und korrigiert, indem die Gruppen nachträglich erneut kategorisiert und die Bilder den passenden räumlichen Organisationsformen zugeteilt wurden.

4.1.2 Analyse der Zellgeometrie superfizieller isolierter Chondrozyten

Es konnte gezeigt werden, dass isolierte, superfizielle Chondrozyten im Zuge der enzymatischen Isolation, unabhängig ihrer vorherigen räumlichen Organisationsform, ihre zellgeometrischen Charakteristika größtenteils verloren. So zeigte sich, dass die Chondrozyten im isolierten Stadium eine Zellmorphologie mit einem durchschnittlich kleineren Aspect Ratio und einer durchschnittlich größeren Roundness als die Chondrozyten im Gewebe aufwiesen. Hieraus ließ sich schließen, dass sich superfizielle Chondrozyten im isolierten Zustand durch den Verlust ihrer EZM abrunden. Dies deckte sich mit der Literatur, in welcher bereits mehrfach beschrieben wurde, dass frisch isolierte Chondrozyten eine runde/spheroidale Zellmorphologie aufweisen (Kuettner et al., 1982, Aydelotte and Kuettner, 1988, Schnabel et al., 2002). Passend dazu war der prozentuale Unterschied zwischen den isolierten Chondrozyten und den diffus organisierten Chondrozyten durchschnittlich nur max. 5,9 % ("Diffus" vs. „Isol.“: AR: 5,9 %, Round: 5,5 %, Circ: 1,8 %, Sol: 0,6 %), während der durchschnittlich prozentuale Unterschied zu den „Strings“ bis zu 28,7 % betrug („Strings“ vs. „Isol.“: AR: 25,5 %, Round: 28,7 %). Im statistischen Vergleich bestätigte sich, dass die superfiziellen Chondrozyten im isolierten Zustand sowohl ihren Aspect Ratio als auch ihre Roundness als Deskriptoren zwischen gesund und krank verloren. So resultierte bei isolierten Chondrozyten der gleiche, statistisch insignifikante Aspect Ratio und die gleiche statistisch insignifikante Roundness unabhängig des Ursprungsgewebes der Chondrozyten („Strings“, „Diffus“, „gemischt“), während sie zeitgleich signifikant unterschiedlich zu den Chondrozyten in einer „Strings“- bzw. einer diffusen Zellformation waren. Die superfiziellen, isolierten Chondrozyten verloren also, hier in Bezug auf die Shape Deskriptoren Aspect Ratio und Roundness, ihre in vivo-Zellmorphologie.

In Bezug auf die Shape Deskriptoren Circularity und Solidity waren die Ergebnisse nicht so eindeutig wie für den AR und die Roundness. So waren bei beiden Shape Deskriptoren nur die isolierten Chondrozyten aus dem „Strings“-Ansatz vs. den isolierten Chondrozyten aus dem „Diffus“-Ansatz insignifikant, hatten also in Bezug auf die Shape Deskriptoren Circ und Sol die gleiche Zell-

Diskussion

morphologie. In den anderen Vergleichen innerhalb der isolierten Chondrozyten zeigten sich signifikante Unterschiede, die Chondrozyten hatten also in Bezug auf ihre Membranprotrusionen nicht exakt die gleiche Zellmorphologie. Im Vergleich mit der Zellmorphologie der Chondrozyten im Gewebe ähnelten die isolierten Chondrozyten in Bezug auf die Shape Deskriptoren Circ und Sol mit einem maximalen prozentualen Unterschied von 1,8 % mehr den diffus organisierten Chondrozyten ("Diffus" vs. „Isol.“: Circ: 1,8 %, Sol: 0,6 %) als den „Strings“-Chondrozyten, zu denen der maximal prozentuale Unterschied bis zu 9,7 % betrug („Strings“ vs. „Isol.“: Circ: 9,7 %, Sol: 2,0 %).

Im statistischen Vergleich waren für die Circularity, bis auf den Vergleich „Isol. aus „Strings““ vs. „Diffus“, alle Vergleiche zwischen den isolierten Chondrozyten und den Chondrozyten im Gewebe signifikant unterschiedlich. Für die Solidity war zusätzlich kein signifikanter Unterschied zwischen den isolierten Chondrozyten aus einem diffusen Ansatz und den „Diffus“-Chondrozyten im Gewebe vorhanden. Dies bestätigte, dass die isolierten Chondrozyten den diffus organisierten Chondrozyten im Sinne einer abgerundeten Zellmorphologie mit wenig Membranprotrusionen stärker ähnelten als den „Strings“-Chondrozyten.

So wurde insgesamt festgestellt, dass die superfiziellen Chondrozyten bei enzymatischer Isolation ihre in-vivo-Zellmorphologie größtenteils verlieren und hierbei ein morphometrisches Bild ähnlich zu den diffus organisierten Chondrozyten, also eine abgerundete Form mit wenig Membranprotrusionen, annehmen. Weiterhin wurde verifiziert, dass es, trotz signifikanter Unterschiede zwischen den Isolationsansätzen, legitim war für die Gewinnung von Chondrozyten für das Aufbringen auf Mikroadhäsionsflächen lediglich makroskopisch intakten, nicht weiter klassifizierten Knorpel zu verwenden, da sich die Chondrozyten in Bezug auf ihre Shape Deskriptoren innerhalb der drei Isolationsansätze nur um max. 2,8 % (Circularity Isol. aus „Strings“ vs. Isol. aus „Gemisch“) voneinander unterschieden (s. Kapitel 3.1.2).

4.1.3 Vorüberlegungen zu dem Aufbringen von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf spezifische Mikroadhäsionsflächen

Bei der Analyse der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen musste bedacht werden, dass aus technischen Gründen nicht der „in vivo-Shape“ der Chondrozyten im Gewebe rekonstruiert werden konnte. Stattdessen wurde ein biomimetisches Modellsystem gewählt, welches in Bezug auf die Verhältnisse der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity den Unterschieden der Zellgeometrien von „gesund“ und „krank“ in vivo entsprach. Es wurden die Mikroadhäsionsflächen „Cytoo-Chips“ verwendet, welche es ermöglichten, eine Chondrozytenpopulation simultan auf zwei verschiedene Zellgeometrie-Schablonen innerhalb eines Modell-Systems aufzubringen. Rolauffs klassifizierte eine „Strings“-Formation im humanen Kniegelenksknorpel als gesunde Organisation, während diffus organisierte Chondrozyten im fortgeschrittenen OA-Stadium auftraten und somit als abnorm, bzw. als krank bezeichnet wurden (Rolauffs et al., 2008). Wurde dieses Erkenntnis mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.1 kombiniert, kam man zu der Schlussfolgerung, dass die Zellgeometrie der „Strings“-Chondrozyten als gesund und die Zellgeometrie der diffus organisierten Chondrozyten als krank definiert werden können. So wurde bereits auch in Kapitel 4.1 gezeigt, dass gesunde superfizielle Chondrozyten eine längliche Zellgeometrie und kranke superfizielle Chondrozyten eine rundliche Zellgeometrie aufwiesen. Hiernach wurden für das Modellsystem „Cytoo-Chip“ jeweils eine biomimetische Adhäsionsfläche, die die Chondrozyten in eine längliche, bzw. in eine rundliche Zellgeometrie dirigierte, ausgewählt.

Der große Vorteil die Chondrozyten auf speziellen biomimetischen Adhäsionsflächen zu kultivieren bestand darin, dass die Chondrozyten hierdurch gezwungen wurden, eine spezifisch-gewünschte Zellgeometrie anzunehmen. Würde man sie nur in Monokulturen ohne geometrische Kontrolle aufbringen, würden sie ein fibroblasten-ähnliches Stadium annehmen (Benya and Shaffer, 1982, Schnabel et al., 2002). Dies betraf sowohl die geometrisch-morphologischen Änderungen, als auch die Verschiebung der Kollagen-Expressions-Muster (Fuss et al., 2000, Stewart et al., 2000) (s. Kapitel 4.3).

Die Kombination der biomimetischen Adhäsionsflächen „H-Shape“ und „O-Shape“ unterschied sich in drei der vier Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Circularity, Solidity) am geringsten von dem Verhältnis der in vivo-Chondrozyten, weshalb im Folgenden die Chondrozyten der „Strings“-Formationen durch den „H-Shape“ und die diffus organisierten Chondrozyten durch den „O-Shape“ repräsentiert wurden. Somit wurde der „H-Shape“ als gesund, und der „O-Shape“ als „krank“ definiert. Bei der Analyse des Modell-Systems war zu beachten, dass grundsätzlich die Chondrozyten auf den Mikroadhäsionsflächen und nicht die Adhäsionsflächen an sich bzgl. der Shape Deskriptoren ausgewertet wurden. Ist im Folgenden von „H-Shape“ bzw. „O-Shape“ die Rede, sind die Chondrozyten mit der geometrisch-kontrollierten Zellform auf den Mikroadhäsionsflächen, nicht die Schablonen an sich, gemeint. Nachfolgend wurde jedoch der Begriff „H-Shape“ gleichwertig mit den Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit der Zellschablone „H-Hantel“ verwendet, analog „O-Shape“ und „O-Disc“.

4.1.4 Vergleich der zellgeometrischen Eigenschaften von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit superfiziellen Chondrozyten im Gewebe

Im Zuge dieser Dissertation wurde erarbeitet, dass superfizielle, isolierte Chondrozyten durch externe Einflüsse in ihren zellmorphologischen Charakteristika verändert werden konnten. So war es möglich aus isolierten, superfiziellen Chondrozyten, die der gleichen Population entstammen, durch das simultane Aufbringen auf die Mikroadhäsionsflächen „H-Shape“ und „O-Shape“ zwei verschiedene zellgeometrische Profile zu erzeugen. Durch die Verwendung der Mikroadhäsionsfläche „H-Shape“ erhielt man eine elliptische Zellgeometrie mit vielen Membranprotrusionen, während die Verwendung der Mikroadhäsionsfläche „O-Shape“ eine rundliche Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen ergab. Somit war es möglich, im Modell-System zwischen den zwei Chondrozytenprofilen in Bezug auf die Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity, einen prozentualen Unterschied von bis zu +31,5 % zu er-

zeugen (Aspect Ratio: +31,5 %, Roundness: -22,3 %, Circularity: -15,5 %, Solidity: -4,4 %). Die Größe der Chondrozyten (Shape Deskriptor Area) wurde bei der Auswertung der Zellgeometrie nicht beachtet, da Mow und Huiques zeigten, dass das Zellvolumen von Chondrozyten um 30-40 % zunimmt, wenn diese aus ihrer EZM entfernt werden (Mow and Huiques, 2005). Somit wäre ein Vergleich der Area im Gewebe mit der Area von Chondrozyten im isolierten Zustand und auf Mikroadhäsionsflächen nicht sinnvoll.

Wie bereits erwähnt repräsentierte das Modell „H-Shape“ Chondrozyten in der „Strings“-Formation, also den gesunden Zustand, während das Modell „O-Shape“ die diffus organisierten Chondrozyten, also den erkrankten Zustand, darstellten. Mit dem erzeugten Unterschied von bis zu +31,5 % (Aspect Ratio) zwischen den zwei Zellprofilen „O-Shape“ und „H-Shape“ kam das Modellsystem den in vivo-Bedingungen sehr nahe. So bestand zwischen diffus organisierten Chondrozyten und „Strings“-Chondrozyten ein natürlicher prozentualer Unterschied von bis zu +26,2 % (Aspect Ratio: +26,2 %, Roundness: -18,0 %, Circularity: -7,2 %, Solidity: -1,5 %). Die Korrektur der Zellform wirkte sich also im Modell-System ähnlich den in vivo-Bedingungen auf alle vier Shape Deskriptoren aus. Den stärksten Einfluss hatte die extern gesteuerte Veränderung der Zellgeometrie dabei auf die längliche Ausprägung der Chondrozyten, beschrieben durch den Shape Deskriptor Aspect Ratio (+31,5 %). Dies ließ den Schluss zu, dass die Korrektur der Kollagen-Genexpression v. a. mit der Korrektur des Aspect Ratios, also dem Längenverhältnis der Chondrozyten, zusammenhängen könnte. Dieser maximal generierte Unterschied von +31,5 % im Modell-System unterschied sich nur um 5,3 % von der Änderung des Aspect Ratios in vivo (+26,2 %). Auch in Bezug auf die anderen Shape Deskriptoren wichen die erzeugten prozentualen Unterschiede im Modell-System um maximal 8,3 % von den in vivo Bedingungen ab (Round: 4,3 %, Circ: 8,3 %. Sol: 2,9 %).

Hierbei funktionierte das Modellsystem im Vergleich zur in vivo-Situation sogar so gut, dass die Korrektur der Zellform die natürlichen Bedingungen im Gewebe in Bezug auf alle vier untersuchten Shape Deskriptoren übertraf. Methodisch wurde also durch die Analyse der Unterschiede der zellgeometrischen Eigenschaften isolierter, superfizieller Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen be-

Diskussion

wiesen, dass durch das Aufbringen isolierter, superfizieller Chondrozyten auf biomimetische Mikroadhäsionsflächen verschiedene definierte Zellgeometrien erzeugt werden können. Das bedeutet, dass das entworfene Modell-System zur Nachstellung der in vivo-Situation geeignet war. Dabei überzeugte die Ähnlichkeit des Modells mit den in vivo-Bedingungen nicht nur im Vergleich der Korrektheit von „krank“ nach gesund“, sondern auch im direkten Vergleich der korrespondierenden Zellgeometrien. So lag für die korrespondierenden Zellgeometrien „Strings“ vs. „H-Shape“ der kleinste prozentuale Unterschied bei 0,6 % (Solidity), der maximale Unterschied betrug 8,1 % (Circularity). Somit konnte v. a. in Bezug auf die Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness und Solidity die „Strings“-Chondrozyten durch den „H-Shape“ sehr ähnlich nachgestellt werden! Bei den korrespondierenden Zellgeometrien „Diffus“ vs. „O-Shape“ lag der minimale prozentuale Unterschied bei 1,6 % (Circularity), die größte Differenz ergab sich mit 5,4 % für den Aspect Ratio. Auch hier war die Aussage gerechtfertigt, dass mit dem Modell „O-Shape“ die in vivo-Bedingungen ähnlich nachgestellt wurden, mehr als gerechtfertigt. Zusammengefasst war die Etablierung des Modell-Systems bei der Nachstellung der in vivo-Bedingungen superfizieller Kniegelenkschondrozyten sowohl in Bezug auf die Nachahmung der einzelnen Chondrozytenstadien „Strings“ und „Diffus“, als auch auf die Generierung des bestehenden prozentualen Unterschieds zwischen den zwei räumlichen Organisationsformen erfolgreich.

Bei der statistischen Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse zeigten sich zwischen den korrespondierenden Zellgeometrien „Strings“ (in vivo) und „H-Shape“ (Modell) in Bezug auf die Parameter Aspect Ratio und Roundness keine signifikanten Unterschiede. Dies bestätigte, wie ähnlich das Modell den in vivo-Bedingungen war, und dass die Shape Deskriptoren Aspect Ratio und Roundness von „Strings“-Chondrozyten im Modell durch den „H-Shape“ exakt repliziert wurden. Zwischen den korrespondierenden Zellgeometrien „Diffus“ und „O-Shape“ waren alle vier Parameter signifikant unterschiedlich. D. h. rein statistisch gesehen wurden die diffus organisierten Chondrozyten durch den „O-Shape“ im Modell nicht exakt repliziert. Da es aber kein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war eine exakte Replikation kranker Chondrozyten zu erzeugen, sondern

das Hauptaugenmerk darauf lag „gesunde“ Chondrozyten zu replizieren und die notwendige Korrektur der Zellgeometrie von „krank“ nach „gesund“ zu ermitteln, war der Vergleich der korrespondierenden Zellgeometrien „Strings“ vs. „H-Shape“ in der vorliegenden Arbeit relevanter und für die Gesamtaussage der wichtigste Vergleich. Da es nicht das zukünftige Ziel darstellt, „kranke“ Chondrozyten zu produzieren, hat die nicht vorhandene Signifikanz zwischen den Chondrozyten mit einem „O-Shape“ und den diffus organisierten Chondrozyten somit keine praktische Relevanz. Es wäre natürlich wünschenswert gewesen, wenn zwischen dem „O-Shape“ und den diffus organisierten Chondrozyten kein signifikanter Unterschied bestehen würde, da der prozentuale Unterschied zwischen den korrespondierenden Zellgeometrien jedoch bei max. 5,1 % (Aspect Ratio) lag, ist dies im Gesamtbild vernachlässigbar. Weiterhin wäre es wünschenswert gewesen, wenn in Bezug auf die Shape Deskriptoren Circularity und Solidity zwischen den jeweiligen korrespondierenden Zellgeometrien keine signifikanten Unterschiede aufgetreten wären. Aber auch hier waren die prozentualen Unterschiede akzeptabel gering.

Aus diesen Daten ergeben sich für zukünftige Projekte diverse Verbesserungsvorschläge. So wäre es eine Überlegung wert, dass anstatt der hier verwendeten, gepoolten Knorpelproben (makroskopisch intakt, nicht näher klassifiziert) reine „Strings“- sowie reine „diffus organisierte“ Proben verwendet werden. Dies würde es ermöglichen die Korrektur der Zellgeometrie in beide Richtungen zu kontrollieren, als auch durch einen gekreuzten Versuch eine Gegenkontrolle zu den bisherigen Versuchen zu erhalten. Weiterhin wäre es vorteilhaft die Auswertung der Bilddateien von den Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen zu optimieren. In dieser Arbeit wurden vor der Auswertung der Zellgeometrie für die Bilddateien ein Threshold erstellt. Könnte dieser umgangen werden, wäre der Vergleich der Shape Deskriptoren der Chondrozyten in vivo und im Modellsystem noch zuverlässiger.

4.2 Analyse der relativen mRNA-Expression von superfiziellen isolierten Chondrozyten aus hyalinem Kniegelenksknorpel

4.2.1 Relative Kollagen mRNA-Expression von superfiziellen, isolierten Chondrozyten mit definierten räumlichen Organisationsformen

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation stellte die Analyse der relativen mRNA-Expression von superfiziellen, isolierten Chondrozyten verschiedener räumlicher Organisationsformen dar, um anhand des gewonnenen Wissens auszusagen, wie sich die enzymatische Isolation auf den Genotyp der Chondrozyten auswirkte. Hierbei war zu beachten, dass die Chondrozyten zum Analysezeitpunkt frisch enzymatisch isoliert waren. Es ließen sich also keine direkten Aussagen über das Verhalten der Chondrozyten im Knorpelgewebe bzgl. ihrer Kollagen mRNA-Expression im Zuge einer OA treffen. Jedoch wäre es in weiteren Schritten möglich einen Vergleich zwischen dem Genexpressionsprofil von superfiziellen, enzymatisch isolierten Chondrozyten und superfiziellen Chondrozyten im Gewebe innerhalb der jeweils entsprechenden räumlichen Organisationsformen anzustreben.

Bei der Analyse der superfiziellen, isolierten Chondrozyten zeigte sich, dass bei allen untersuchten Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1 und 6A1) eine Änderung der relativen Kollagen mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“) hinweg stattfand. Es wurde beobachtet, dass die durchschnittliche mRNA-Expression bei den Kollagentypen 1A2, 2A1 und 3A1 zunächst auf einem relativ ähnlichen Niveau verharrte, um dann bei der räumlichen Organisationsform der „Big Clusters“ einen Expressionshöhepunkt aufzuweisen. Nur bei Kollagentyp 6A1 lag der durchschnittliche Expressionshöhepunkt bei den „Doublestrings“. Insgesamt spielte sich dabei die relative mRNA-Expression bei den Kollagentypen 1A2 und 3A1 auf einem höheren Expressionslevel ab als bei den Kollagentypen 2A1 und 6A1.

Somit wurde zusammenfassend erarbeitet, dass die in „Big Cluster“-organisierten Chondrozyten die höchste Expressionsaktivität aufwiesen. Hierbei

könnte es sich also um einen kritischen Zeitpunkt in der OA-Pathogenese handeln, jedoch wurden in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der relativen Kollagen mRNA-Expression zwischen den räumlichen Organisationsformen gefunden. Eine mögliche Erklärung für diese Datenlage stellt die enzymatische Isolation dar, in der die gewebespezifischen Expressionsprofile möglicherweise verloren gingen. Dass es Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen isolierten Chondrozyten und solchen im nativen Gewebe gibt, ist bekannt (Hayman et al., 2006).

Die Möglichkeit, dass es sich bei den „Big Clustern“ um einen kritischen Zeitpunkt in der OA-Pathogenese handelte passt insofern, dass die Formation „Cluster“ v. a. in OA-geschädigtem Kniegelenksknorpel gefunden wurden (Poole, 1997, Quintavalla et al., 2005). Die Cluster spielten hierbei eine wichtige Rolle für die Pathogenese der OA, was sich u. a. durch ihre große Spannweite an Aktivitäten und Differenzierungsmarker zeigte (Lotz et al., 2010). Die Ergebnisse deckten sich also insofern mit der Literatur, dass Chondrozyten in Cluster-Formationen eine erhöhte Aktivität aufwiesen (Lotz et al., 2010), was vermutlich ein Versuch darstellte die geschädigte EZM zu retten (Miosge et al., 2004, Hermansson et al., 2004). Mitchell sprach den Clustern sowohl eine Matrix-synthetisierende, als auch eine Matrix-destruierende Funktion zu (Mitchell et al., 1992). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, fanden in makroskopisch intaktem Knorpel in der Nähe zu frühen fokalen OA-Schäden eine Reorganisation der Chondrozyten statt (Rolauffs et al., 2010). Rolauffs ging hierbei davon aus, dass die metabolische Aktivität der Chondrozyten gesteigert wird, um den fokalen Knorpelschaden zu beheben und dass dies eine Reorganisation der räumlichen Chondrozytenverteilung bedingte (Rolauffs et al., 2010). Da jedoch durch die Reorganisation und gesteigerte metabolische Aktivität der Chondrozyten die OA nicht gestoppt wurde, könnte man annehmen, dass Chondrozyten in Clusters-Formationen bei ihrem Versuch die geschädigte EZM zu retten, erfolglos blieben.

Die obige Beschreibung bzgl. des Genexpressionsprofil der Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen ließ die Aussage zu, dass Chondrozyten im enzymatisch isolierten Zustand, trotz geringer Abweichungen

Diskussion

zwischen den unterschiedlichen Organisationsstadien, in allen vier Kollagentypen das gleiche Genexpressionsprofil auswiesen. Diese Beobachtung wurde durch die statistischen Ergebnisse, welche größtenteils keine signifikanten Unterschiede zwischen den räumlichen Organisationsformen aufzeigten, bestärkt. Die einzige Ausnahme stellte hierbei das Genexpressionsprofil der superfiziellen Chondrozyten für den Kollagentyp 1A2 dar: Hier nahm die relative Kollagenexpression von Chondrozyten in der „Strings“-Formation im Vergleich zu den diffus organisierten Chondrozyten um den Faktor 3,3 zu. Das bedeutete, dass Chondrozyten aus einem diffus organisierten Stadium, trotz der enzymatischen Isolation, ein signifikant höheres Kollagentyp 1A2-Level exprimierten als Chondrozyten der „Strings“-Formation. Dieses Ergebnis wurde durch die positiv signifikante Korrelation des Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression mit der räumlichen Organisation der Chondrozyten über alle räumlichen Organisationen hinweg bestätigt. Dies bedeutet, dass die mRNA-Expression des knorpelunphysiologischen Kollagentyp 1A2 in osteoarthrotisch verändertem Knorpel so stark war, dass selbst im frisch enzymatisch isolierten Zustand Unterschiede zwischen relativ gesunden und osteoarthrotisch-belasteten Chondrozyten detektierbar waren.

Beim Vergleich der relativen Kollagenexpressionen innerhalb einer räumlichen Organisationsform wurden für die Anfangsstadien „Strings“ und „Doublestrings“ keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Erst ab der fortgeschrittenen Organisationsform der „Small Clusters“, bis hin zum Endstadium der diffus organisierten Chondrozyten unterschieden sich die relativen Kollagenexpressionen innerhalb einer räumlichen Organisationsform signifikant voneinander. So nahm hier die relative mRNA-Expression von Kollagentyp 1A2 vs. Kollagentyp 2A1 und 6A1 sowie von Kollagentyp 3A1 vs. Kollagentyp 6A1 signifikant ab. Hieraus ließ sich schließen, dass die enzymatische Isolation nur in den räumlichen Organisationsformen „Strings“ und „Doublestrings“ zu einem Verlust des Genexpressionsprofils führte, während ab der Organisationsform der „Small Clusters“ bereits ein arthrotischer Genotyp deutlich wurde, welcher so stark ausgeprägt war, dass ihn die enzymatische Isolation nicht beeinflusste. Der arthrotische Genotyp zeichnete sich hier durch eine erhöhte Kollagentyp 1A2 mRNA-

Expression und eine herunterregulierte mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1 und 6A1 aus. Die zunehmende Ausprägung des arthrotischen Genotyps zeigte sich auch durch die über die räumlichen Organisationsformen hinweg kontinuierlich zunehmende Ratio zwischen der Kollagentypen 1A2 und 6A1. So exprimierten Chondrozyten der „Strings“-Formation durchschnittlich nur 1,2-fach mehr Kollagentyp 1A2 als 6A1, Chondrozyten in einer diffus organisierten Anordnung exprimierten dagegen bis zu 6,8-fach mehr Kollagentyp 1A2 als 6A1.

Für die Hochregulation der relativen Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression der isolierten Chondrozyten verschiedener Organisationsformen ergaben sich diverse mögliche Erklärungsansätze:

Zum einen könnte die erhöhte Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression der Chondrozyten durch die enzymatische Isolation bedingt sein. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Chondrozyten bei enzymatischer Isolation und Aufbringen in Monolayerkulturen dazu neigten ihren knorpeltypischen Phänotyp, basierend auf einer Kollagentyp II mRNA-Expression, zu verlassen und stattdessen einen Phänotyp mit der Expression des knorpelunphysiologischen Kollagentyp I anzunehmen (von der Mark et al., 1977, Marlovits et al., 2004, Schnabel et al., 2002). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei diesen Arbeiten die Chondrozyten über einen längeren Zeitraum kultiviert wurden und hierbei der „Switch“ von Kollagentyp II zu Kollagentyp I zumeist nach ca. drei Wochen stattfand (von der Mark et al., 1977, Schnabel et al., 2002), während in der vorliegenden Arbeit die Kollagenexpression ohne Kultivierung und bereits nach 24 Stunden Isolationszeit beurteilt wurde. Trotzdem zeigte sich in beiden Herangehensweisen ein ähnliches Expressionsbild.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz stellte folgender Zusammenhang dar:

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besteht gesunder, humaner Kniegelenksknorpel zu 90-95 % aus Kollagentyp II (Mayne, 1989), welcher die Basis des hydrodynamischen Dämpfungssystems darstellt (Buckwalter and Mankin, 1997) und somit für die strukturelle Integrität des gesunden Knorpels verantwortlich ist (Kühn et al., 1987). Im Zuge einer Osteoarthrose-Erkrankung wurde ein Rückgang der Proteinmenge von Kollagentyp II beobachtet (Poole, 1999). Parallel

Diskussion

dazu wurde jedoch in OA-geschädigten Knorpelregionen ein Anstieg der Kollagentyp II mRNA-Expression erfasst (Miosge et al., 2004, Aigner et al., 1992, Aigner et al., 2006b, Sato et al., 2006). Dieser leichte Anstieg der Kollagentyp II mRNA-Expression wurde auf einen Regenerationsversuch der Chondrozyten zurückgeführt, um den Kollagenverlust in der Matrix zu kompensieren (Miosge et al., 2004) und die geschädigte EZM zu regenerieren (Hermansson et al., 2004). Diesen Rückschluss zog Miosge daraus, dass er die Kollagentyp II-mRNA v. a. in den Clustern, also den mittleren Erkrankungsstadien, nachwies (Miosge et al., 2004). In der vorliegenden Dissertation exprimierten die superfiziellen, isolierten Chondrozyten ebenfalls durchschnittlich die meiste Kollagentyp II-mRNA in den räumlichen Organisationsformen „Small Clusters“ und „Big Clusters“ (s. Kapitel 3.2.1). Hier scheinen die Ergebnisse mit Miosges Erkenntnissen übereinzustimmen. Da sich die Kollagentyp 2A1 mRNA-Expression zwischen den räumlichen Organisationsformen nicht signifikant unterschied, kann jedoch keine definitive Aussage getroffen werden. Auch unterlag die Höhe der Kollagentyp 2A1 mRNA-Expression der superfiziellen isolierten Chondrozyten in allen räumlichen Organisationsformen deutlich der Expressionshöhe der Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression, so dass die Ergebnisse der Literatur nicht als vollständiger Erklärungsansatz für die vorliegenden Ergebnisse dienen können. Insofern sind die hier erarbeiteten Daten als neu einzustufen.

Weiterhin ist zu beachten, dass der knorpelunphysiologische Kollagentyp I im gesunden hyalinen Knorpel nicht auffindbar ist (Van der Rest and Garrone, 1991). Hingegen wurde in arthrotischem Knorpel eine Hochregulation der knorpelunphysiologischen Kollagentyp I mRNA-Expression beobachtet (Sato et al., 2006, Miosge et al., 2004, Aigner et al., 2006b). Dies zeigte sich auch in den vorliegenden Ergebnissen. Dabei war dieser Effekt so stark, dass er selbst durch die enzymatische Isolation nicht gelöscht wurde. Zusätzlich wurde beobachtet, dass auch im isolierten Zustand die Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression in den diffus organisierten Chondrozyten deutlich höher war als in „Strings“-Chondrozyten. Dies bestätigte, dass die diffus organisierten Chondrozyten funktionell einem späteren OA-Grad entsprechen als die Chondrozyten in der „Strings“-Formation.

4.2.2 Relative Kollagen mRNA Expression von superfiziellen isolierten Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen

Nachdem die Kollagenexpression superfizieller, isolierter Chondrozyten aus verschiedenen räumlichen Organisationsformen beurteilt wurde, wurde im nächsten Schritt die Kollagenexpression superfizieller, isolierter Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen analysiert. In diesem Modellsystem sollte die relative Kollagen-mRNA-Expression von gesunden und erkrankten Chondrozyten im Gewebe (in vivo) möglichst treffend reproduziert werden. Dabei wurden die „Strings“-Chondrozyten als gesund und die diffus organisierten Chondrozyten als erkrankt betrachtet (Rolauffs et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass die Kollagenexpression von Chondrozyten, die derselben Population entstammten, durch das Aufbringen auf zwei verschiedene biomimetische Mikroadhäsionsflächen, hier „H-Shape“ und „O-Shape“, signifikant veränderbar war. So exprimierten Chondrozyten mit der Zellgeometrie „O-Shape“ durchschnittlich 1,4-fach mehr Kollagentyp 1A2 als Chondrozyten mit der Zellgeometrie „H-Shape“. Im vorherigen Kapitel wurde bereits beschrieben, dass arthrotisch erkrankte Chondrozyten mehr Kollagentyp I als gesunde Chondrozyten exprimieren (Miosge et al., 2004, Aigner et al., 1992, von der Mark et al., 1977). J. Schröder konnte in seiner Inaugural-Dissertation zeigen, dass im Gewebe diffus organisierte, erkrankte superfizielle Chondrozyten mehr Kollagentyp 1A2 exprimierten, als gesunde Chondrozyten in der „Strings“-Formation (Schröder, 2017). Somit passte die Beobachtung dieser Dissertation, dass die Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit einem „O-Shape“, welche die diffus erkrankten Chondrozyten repräsentieren, mehr Kollagentyp 1A2 produzieren, als Chondrozyten mit einem „H-Shape“, welche „Strings“-Chondrozyten, also gesunde Zellen repräsentieren, gut zu den bisherigen Ergebnissen. Therapeutisch betrachtet konnte durch die Korrektur der Zellgeometrie von rundlich („O-Shape“) nach länglich/elliptisch („H-Shape“) eine Reduktion der relativen Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression um 29,6 % erzielt wurde. J. Schröder legte dar, dass im Gewebe die diffus organisierten Chondrozyten 2,3-fach mehr Kollagentyp 1A2 als Chondrozyten der „Strings“-Formation exprimierten. D. h. theoretisch muss die Kollagentyp 1A2 mRNA-

Diskussion

Expression um 56,9 % gesenkt werden, um den erkrankten „diffus“ organisierten Zustand der Chondrozyten in ein gesundes Stadium mit einer „Strings“-Formation zu überführen (Schröder, 2017). Im in-vitro-Modellsystem der vorliegenden Dissertation gelang eine Reduktion der Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression von erkrankt zu gesund um 29,6 %. Das erstellte Modell näherte sich den in-vivo-Bedingungen also bis auf 27,3 % genau an, traf diese jedoch noch nicht exakt. Eine mögliche Erklärung war, dass bei dem Modell-System Mikroadhäsionsflächen verwendet wurden, die in einem zweiten Schritt in der Zukunft weiter angepasst werden könnten. Dies ist hier nicht erfolgt, da es das Ziel der vorliegenden Arbeit war die prinzipielle Machbarkeit der Phänotyp-Reprogrammierung durch biomimetische Mikroadhäsionsflächen zu untersuchen. Weiterhin wurden die verwendeten Chondrozytenpopulationen nicht detailliert kategorisiert, außer dass sie aus makroskopisch intakten Knorpelgeweben isoliert wurden. So wären für ein Folgeprojekt folgende Verbesserungen denkbar: Zum einen sollten speziell angefertigte Mikroadhäsionsflächen verwendet werden. Zum anderen wäre es vorzuziehen explizit diffus organisierte Chondrozyten auf die Mikroadhäsionsflächen aufzubringen, sowie zur Gegenkontrolle Chondrozyten der „Strings“-Formation zu verwenden und unter diesen Bedingungen die veränderte Genexpression auf den Mikroadhäsionsflächen erneut zu beurteilen.

Bei der weiteren Betrachtung der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen zeigte sich, dass in Bezug auf die Kollagentypen 2A1 und 3A1 zwischen den zwei Mikroadhäsionsflächen keine signifikanten Veränderungen stattfanden. D. h. der Effekt der Mikroadhäsionsflächen bestand bei der Shape-Korrektur von „O-Shape“ zu „H-Shape“ in einer selektiven Kollagentyp 1A2- und 6A1 mRNA-Reduktion. Hierbei zeigten sich beim Vergleich der relativen mRNA-Expression innerhalb der zwei Zellgeometrien jeweils die gleichen signifikanten Unterschiede: So war jeweils der Kollagentyp 1A2 signifikant anders als die Kollagentypen 2A1 und 3A1. Weiterhin unterschied sich der Kollagentyp 2A1 signifikant von der Kollagentyp 6A1 mRNA-Expression. Das bedeutete, dass durch das Aufbringen der isolierten Chondrozyten auf die Mikroadhäsionsflächen ein spezielles Kollagenexpressionsmuster mit Unterschieden zwischen den Kol-

lagentypen erzeugt wurde, welches sich in den zwei verschiedenen Zellgeometrien „H-Shape“ und „O-Shape“ in dem Verhältnis der Kollagentypen zueinander gleich, in der jeweiligen Expressionshöhe jedoch unterschied. Hierzu liegt keine vergleichbare Literatur vor, so dass die hier verwendete Methodik zur Phänotyp-Korrektur durch Mikroadhäsionsflächen sowie die resultierenden Einsichten in Bezug auf das resultierende Expressionsprofil als neu einzustufen sind.

Anwendungspotential zeigen die zellgeometrisch-kontrollierten Chondrozyten beispielweise bei der Optimierung der Autologen-Chondrozyten-Transplantationsmatrix, welche bei fokalen Knorpelschäden zum Einsatz kommt. Bei ACTs werden Chondrozyten isoliert, kultiviert und als Transplant eingesetzt (Löhnert et al., 1999) Hierbei entsteht v. a. eine Art hyalinartiger Regeneratknorpel, der jedoch dem physiologischen kniegelenkstypischen hyalinen Knorpel unterlegen ist (Niemeyer et al., 2013). Würde man die ACT-Membranen um ein Strukturgitter mit Anhaltspunkten für die Chondrozyten erweitern, so dass die transplantierten Chondrozyten eine Form analog zu den in vivo-Chondrozyten einnehmen, könnte man die knorpelphysiologische Kollagentyp 2A1-Produktion steigern und somit einen physiologischeren Knorpelersatz erzeugen. Hierbei ist relevant, dass die Chondrozyten, wie bei der ACT üblich, auf eine Membran aufgebracht werden, da Chondrozyten ohne spezifischen Kontakt zur EZM ihre DNA-Synthese einstellen (Watt et al., 1988), bzw. sogar Apoptose begehen (Chen et al., 1997). Eine exaktere Nachstellung der in vivo-Bedingungen wäre durch die Weiterentwicklung des hier verwendeten 2D Chip-Modell-System in ein 3D-Modell möglich. Dies birgt auch den Vorteil, dass 3D-Kulturen ein höheres chondrogenes Potential aufweisen als 2D-Kulturen (Caron et al., 2012). Außerdem könnte man zur Optimierung die Zeit zwischen der enzymatischen Isolation und der Genexpressionsanalyse variieren (Schnabel et al., 2002, Benya and Shaffer, 1982).

4.3 Zusammenfassender Vergleich der zellgeometrischen und genotypischen Eigenschaften superfizieller Chondrozyten

Im letzten Teil der Diskussion wurden die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2 gemeinsam betrachtet, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Zellgeometrie und der Kollagenexpression der Chondrozyten zu diskutieren.

Bereits 1983 zeigte Glowacki, dass zwischen der Zellmorphologie, der Zellproliferation und der phänotypischen mRNA-Kollagenexpression von Chondrozyten ein Zusammenhang besteht. Rundlich gehaltene Zellen wiesen hierbei einen Chondrozyten-typischen Phänotyp auf, während Chondrozyten mit einer flachen Morphologie in ihren Eigenschaften den Fibroblasten ähnelten (Glowacki et al., 1983). Dies deckt sich nicht mit der Diskussion aus Kapitel 4.1, da in der vorliegenden Dissertation Chondrozyten mit einer länglichen Zellgeometrie als gesund und Chondrozyten mit einer rundlichen Zellgeometrie als krank definiert wurden (Rolauuffs et al., 2008). Die Beschreibung in dieser Arbeit bezog sich dabei jedoch auf Chondrozyten im Gewebe, also *in vivo*, und wurde über spezielle Shape Deskriptoren, v. a. über die Seitenverhältnisse (AR), vermessen, während die Chondrozyten in der Literatur zumeist in Kulturen, also *in vitro*, und in Bezug auf Zellausläufer mit Fibroblasten verglichen wurden (Miosge et al., 2004, Murray et al., 2010, von der Mark et al., 1977).

Bei der Analyse der relativen Kollagen-mRNA-Expression der isolierten Chondrozyten wurden zwischen den räumlichen Organisationsformen, bis auf den signifikanten Unterschied zwischen den „Strings“ und den diffus organisierten Chondrozyten, keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Dies ist insofern nachvollziehbar, als dass die Chondrozyten bei der enzymatischen Isolation vermutlich ihren spezifischen Shape verloren (s. Kapitel 4.1) und hierdurch auch ihr spezifisches Genexpressionsprofil einbüßten (s. Kapitel 4.2.1), so dass sich die Chondrozyten der einzelnen räumlichen Organisationsformen im isolierten Zustand untereinander mehr ähnelten als im Gewebe. Innerhalb der einzelnen Organisationsformen wirkte sich dieser Effekt am stärksten auf die Chondrozyten der „Strings“ und „Doublestrings“-Formationen aus, während die Chondrozyten in Clustern und in einer diffusen Anordnung ihren arthrotischen Genotyp im frisch isolierten Zustand beibehielten. Zeitgleich veränderte sich die

Zellgeometrie der Chondrozyten von einer länglichen Zellform mit vielen Membranprotrusionen („Strings“) zu einer rundlichen Zellform mit wenig Membranprotrusionen („Diffus“).

Wie bereits erwähnt behielten die Chondrozyten in den Clusters-Formationen und in einer diffusen Anordnung ihren arthrotischen Genotyp bei, d. h. die Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression wurde hochreguliert, während die mRNA-Expression der Kollagentypen 2A1 und 6A1 runterreguliert wurden. Da die „Small Clusters“ bereits ein fortgeschrittenes Arthrose-Stadium darstellten, erschien es logisch, dass eine gesteigerte Kollagentyp 1A2 Expression und eine gesenkte Kollagentyp 2A1 Expression vorlagen. In der bisherigen Literatur wurde zumeist die Gesamtmasse aller isolierten Chondrozyten beurteilt (Miosge et al., 2004, Schnabel et al., 2002, Sato et al., 2006, Aigner et al., 2006b). Anhand der hier vorliegenden Einteilung in die mikroskopisch differenzierbaren Stadien war es nun möglich, die Veränderung der Expressionsprofile explizit auf die räumlichen Organisationsformen „Small Clusters“, „Big Clusters“ und diffus organisierte Chondrozyten zurückzuführen, denn nur diese räumlichen Organisationsformen wiesen, wenn sie isoliert vorlagen, ein arthrotisch spezifisches Expressionsmuster auf. Mit zunehmendem Arthrosegrad nimmt die Zellanzahl zu (Felka et al., 2016, Mankin and Lippiello, 1970), d. h. wenn die Gesamtmasse an Chondrozyten beurteilt wurde, überwiegte die Anzahl der Chondrozyten in „Clusters“ und diffuser Anordnung die „Strings“ und „Doublestrings“-Chondrozyten. Also besteht die Gesamtmasse der beurteilten Chondrozyten in der Literatur, v. a. bei makroskopisch fortgeschrittener Arthrose, wahrscheinlich hauptsächlich aus Chondrozyten in der „Clusters“-Formation oder in einer diffus organisierten Anordnung. Bei der Betrachtung der hier vorliegenden Daten war jedoch bereits bei den „Strings“ und den „Doublestrings“ ein Trend zum arthrotischen Genotyp erkennbar. D. h. entweder hatte der Shape-Verlust durch die enzymatische Isolation auch hier einen Effekt auf das Genexpressionsprofil der Chondrozyten, nur wurde zu diesem Zeitpunkt noch kein Signifikanzniveau erreicht, oder es fanden in den Chondrozyten durch die meist benachbart liegende OA-Läsionen (Rolaufts et al., 2008) bereits genotypische Veränderungen

Diskussion

statt, die sich bei den „Doublestrings“ schon in der räumlichen Neuorganisation anzeigten, in den „Strings“ jedoch phänotypisch noch nicht erkennbar waren.

Zusammenfassend kann also durchaus gesagt werden, dass zwischen der Zellgeometrie der Chondrozyten und der relativen Kollagen mRNA-Expression dieser Chondrozyten ein Zusammenhang bestand. Auf Grund der verwendeten Techniken ließen sich keine direkten Korrelationen zwischen der Zellgeometrie und der Genexpression der Chondrozyten berechnen; hierzu müsste eine Analyse zur Einzelzellgeometrie und an derselben Zelle eine Single Cell PCR durchgeführt werden. Dies ist technisch machbar, stand aber zur Zeit dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Trotzdem war erkennbar, dass sich die Chondrozyten im Verlauf der OA von einer länglichen Zellgeometrie mit vielen Membranprotrusionen (hoher Aspect Ratio, niedrige Roundness, niedrige Circularity, niedrige Solidity) zu einer rundlichen Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen abkugeln (niedriger Aspect Ratio, hohe Roundness, hohe Circularity, hohe Solidity), während gleichzeitig die knorpelunphysiologische Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression sowohl in enzymatisch isolierten Chondrozyten (diese Dissertation) als auch in Chondrozyten im Gewebe von „Strings“ zu diffus organisierte Chondrozyten anstieg (Schröder, 2017).

Das gleiche Bild zeigte sich im verwendeten Modellsystem zur Kontrolle der mRNA-Expression über die Kontrolle der Zellgeometrie: Wurden die isolierten, superfiziellen Chondrozyten aus dem uniformen Isolationsansatz auf die spezifischen Shapes der Mikroadhäsionsflächen gesetzt, erhielten sie über die extern erzwungene Zellgeometrie ein moduliertes Genexpressionsprofil (s. Kapitel 3.1.3 und 3.3.2). Im Modellsystem hatten Chondrozyten mit einem „H-Shape“, die „Strings“ simulierten, eine längliche Zellgeometrie mit vielen Membranprotrusionen (hoher Aspect Ratio, niedrige Roundness, niedrige Circularity, niedrige Solidity), sowie eine niedrigere Kollagentyp 1A2 mRNA-Expressionshöhe, im Gegensatz zu Chondrozyten mit einem „O-Shape“, welche die diffuse Organisationsform simulierten und eine rundliche Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen (niedriger Aspect Ratio, hohe Roundness, hohe Circularity, hohe Solidity), sowie eine höhere Kollagentyp 1A2 mRNA-Expressionshöhe aufwiesen. Der Vergleich mit der Literatur fiel etwas schwer, da hier v. a. Be-

richte über isolierte Chondrozyten in Kulturen oder im osteoarthrotischen Knorpel bestehen. Trotzdem zeigten sich teilweise Parallelen zu den Versuchsergebnissen: Bereits 1983 beschrieb Glowacki einen Zusammenhang zwischen der Zellgeometrie und der phänotypischen Genexpression von isolierten Chondrozyten. So verhielten sich Chondrozyten, die in einer dreidimensional-rundlichen Zellgeometrie gehalten wurden entsprechend dem Chondrozyten-typischen Phänotyp. D. h. sie wiesen eine runde Zellgeometrie auf und proliferierten nur sehr langsam. Im Gegensatz dazu nahmen Chondrozyten, die eher in eine zweidimensionale-flache Ausrichtung gezwungen wurden einen eher Fibroblasten-ähnlichen Charakter an: Die Chondrozyten zeigten eine abgeflachte Morphologie, wuchsen schneller und veränderten ihren Stoffwechsel (Glowacki et al., 1983). Da in dieser Arbeit die Chondrozyten nur in 2D betrachtet wurden, sind Glowackis Beobachtungen nicht eins zu eins auf die vorliegenden Ergebnisse übertragbar. Auch von der Mark berichtete, dass isolierte Chondrozyten in Kultur verschiedene Phänotypen aufweisen. So beschrieb er, dass v. a. flache, Fibroblasten-ähnliche Chondrozyten am Rande der Chondrozytenkolonien Kollagentyp I synthetisieren, während runde, bzw. polyglonale Chondrozyten, welche v. a. in der Mitte der Kolonien lagen, Kollagentyp II synthetisierten. Hierbei schloss von der Mark jedoch eine strikte Korrelation zwischen der Zellmorphologie und dem Kollagenexpressionsprofil der Chondrozyten aus, da benachbarte Chondrozyten mit einer ähnlichen Zellmorphologie unterschiedliche Genexpressionsprofile aufwiesen. Weiterhin stellte von der Mark fest, dass Chondrozyten, die allein, bzw. am Rand einer Kolonie lagen, ihren Phänotyp früher umstellten. Dies führte er auf eine Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Interaktion zwischen den Chondrozyten zurück, was den Chondrozyten in den Kolonien Stabilität verlieh (von der Mark et al., 1977). Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Veränderungen der Chondrozyten im arthrotischen Knorpel darstellen, da auch Felka ein Verlust der PZM im Zuge der OA beschrieb, welche den Chondrozyten ebenfalls Stabilität bietet (Felka et al., 2016). Auch Miosge beschrieb einen Zusammenhang zwischen einer länglichen, fibroblasten-ähnlichen Zellform von Chondrozyten, welche Kollagentyp I exprimieren, während Kollagentyp II von „normalen“ Chondrozyten synthetisiert wurde (Miosge et

al., 1998). Dem entgegen steht die Aussage von Lee, welcher beschrieb, dass isolierte Chondrozyten in homogener Kultur ihren morphologischen und metabolischen Charakter beibehielten, dabei jedoch Unterschiede in den Subpopulationen (verschiedene Tiefe des Knorpels) bestanden (Lee et al., 1998). Auch hier deckten sich die Ergebnisse der Literatur in der Definition der Zellmorphologie gesunder und kranker Chondrozyten nicht mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Dissertation. Hier ist nochmal zu betonen, dass in der vorliegenden Arbeit nur die Chondrozyten der superfiziellen Zone betrachtet wurden, welche sich in ihren Eigenschaften von den Chondrozyten in den tieferen Schichten abgrenzen (Bayliss et al., 1983, Palfrey and Davies, 1966, Eger et al., 2002, Lee et al., 1998).

Aus den aufgeführten Diskussionspunkten ließ sich schlussfolgern, dass sich sowohl durch osteoarthrotische Veränderungen im Kniegelenk als auch durch die Isolation der Chondrozyten oder durch das Aufbringen der Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen mit definierten Adhäsionspunkten die Zellgeometrie der Chondrozyten veränderte und hierdurch auch das Genexpressionsprofil der Chondrozyten beeinflusst wurde. Hierbei war jedoch nur beim Einsatz der Mikroadhäsionsflächen die genaue Zellgeometrie der Chondrozyten und somit auch das Genexpressionsprofil steuerbar, während die Veränderungen im osteoarthrotischen Knorpel bzw. bei isolierten Chondrozyten unkontrolliert abliefen. Dies bedeutet, dass in dieser Arbeit erstmalig über die Kontrolle der Zellgeometrie superfizieller Chondrozyten durch das Aufbringen auf biomimetische Adhäsionsflächen eine Kontrolle über die mRNA-Expression der jeweiligen Chondrozyten erreicht wurde und hierdurch die Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression signifikant um 29,6 % gesenkt wurde. Somit stellt der Einsatz von Mikroadhäsionsflächen im Bereich des tissue engineering eine zukunftsrelevante Erweiterung der bisherigen Therapiemethoden der Osteoarthrose da, z. B. bei der Konstruktion von ACT-Membranen (s. Kapitel 4.2.2).

5 Zusammenfassung

Osteoarthrose (OA), im Sprachgebrauch „Arthrose“ genannt, ist eine bisher nicht vollständig verstandene, degenerative Erkrankung des gesamten Gelenks. Hierbei ist das Kniegelenk am häufigsten betroffen. Das Kniegelenk setzt sich aus drei artikulierenden Knochen zusammen, welche an ihren Gelenkflächen von hyalinem Knorpel überzogen sind. Der hyaline Knorpel besteht v. a. aus extrazellulärer Matrix und weist als einzig vorkommende Zellart Chondrozyten auf. Hyaliner Knorpel untergliedert sich in verschiedene Zonen. Die Chondrozyten der obersten Knorpelschicht, die superfizielle Zone, weisen eine besondere spezifische räumliche Organisationsform auf. Diese verändert sich im Zuge einer progredienten OA. So herrschen in der superfiziellen Zone gesunden Kniegelenksknorpels v. a. „Strings“ vor, welche im Verlauf der OA-Erkrankung über „Doublestrings“, „Small Clusters“ und „Big Clusters“ in eine diffus organisierte Anordnung übergehen. Diese verschiedenen räumlichen Organisationsformen der einzelnen Chondrozyten der superfiziellen Zone wurden in der vorliegenden Dissertation näher untersucht. So wurde anhand verschiedener quantitativer Shape Deskriptoren die geometrischen Maße der einzelnen Chondrozyten innerhalb der jeweiligen Organisationsformen ermittelt. Es zeigte sich, dass Chondrozyten im nativen Gewebe in der gesunden „Strings“-Formation eine elliptische Zellform mit vielen Membranprotrusionen aufwiesen, während erkrankte, diffus organisierte Chondrozyten im Gewebe eine rundliche Zellgeometrie mit wenig Membranprotrusionen zeigten. Mithilfe der qRT-PCR wurde das relative Genexpressionsprofil der Chondrozyten verschiedener räumlicher Organisationsformen nach enzymatischer Isolation in Bezug auf die Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 analysiert. Dabei ergab sich, dass innerhalb der einzelnen räumlichen Organisationsformen ab den „Clustern“ signifikante Unterschiede zwischen den relativen mRNA-Expressionen der Kollagentypen 1A2 vs. 2A1 und 6A1, sowie zwischen den Kollagentypen 3A1 und 6A1 vorherrschen. Hieraus ließ sich schließen, dass ab der räumlichen Organisationsform „Small Clusters“ ein arthrotischer Genotyp, gekennzeichnet durch ein starke Hochregulation des knorpelunphysiologischen Kollagentyp 1A2, vorlag, welcher durch die enzymatische Isolation nicht moduliert werden konnte. Über alle

Zusammenfassung

räumlichen Organisationsformen hinweg zeigte sich zusätzlich eine signifikante Hochregulation des knorpelunphysiologischen Kollagentyp 1A2.

Weiterhin wurden biomimetische Mikroadhäsionsflächen verwendet, deren geometrische Formen so gewählt wurden, dass sie als Modellsystem der Zellgeometrien im nativen Gewebe verwendet werden konnten. Dabei simulierten die Mikroadhäsionsflächen „H-Shape“ die Zellgeometrie gesunder in vitro-„Strings“-Chondrozyten“ und „O-Shape“ die Zellgeometrie diffuser in vitro-Chondrozyten. Dieses Modellsystem wurde verwendet, um isolierte Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen aufzubringen. Die erfolgreiche Anwendung dieses Modellsystems wurde anhand der zellgeometrischen Eigenschaften Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity bestätigt. Hierbei näherte sich der erzeugte Unterschied „gesund vs. krank“ des Modellsystems auf mind. 2,9 % (Solidity) bis max. 8,3 % (Circularity) dem Verhältnis im Gewebe an. Zusätzlich wurde die relative mRNA-Expression der Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen in Bezug auf die Kollagentypen 1A2, 2A1, 3A1 und 6A1 analysiert. Es zeigte sich, dass durch die Anwendung der spezifischen Zellgeometrien die knorpelunphysiologische Kollagentyp 1A2 mRNA-Expression von „O-Shape“ zu „H-Shape“ um 29,6 % gesenkt werden konnte. Dies bedeutete, dass die Anwendung des „H-Shapes“ einen therapeutischen Effekt von knapp 30% erzeugte. Im Vergleich zur relativen Kollagen mRNA-Expression der superfiziellen Chondrozyten im Gewebe wich der generierte Unterschied „gesund vs. OA“ in Bezug auf die relative Kollagentyp 1A2-mRNA im Modellsystem nur um 27,9 % von der Veränderung im Gewebe ab. Zusammengefasst war es möglich, durch die Herstellung spezifischer Zellgeometrien isolierter Chondrozyten die mRNA-Expression des knorpelunphysiologischen Kollagentyps 1A2 signifikant um 30% zu senken. Ein mögliches Anwendungsgebiet der hier erlangten Erkenntnisse wäre eine bessere Früherkennung von fokalen OA-Läsionen (z.B. mittels Multiphotonenmikroskopie), welche spezifische Zellgeometrien im Gewebe erkennt, oder eine therapeutische Anwendung durch die Herstellung spezifischer Zellgeometrien, z. B: bei der Herstellung von Biomaterialien zur Autologen Chondrozytentransplantation (ACT), um knorpelphysiologischeres Regeneratgewebe zu erzeugen.

6 Anhang

6.1 Protokolletablierung zur Extraktion der mRNA von Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen

Tabelle 30 Extrahierte mRNA-Proben zur Validierung einer Methode für die Verarbeitung der Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der verschiedenen Versuchsansätze. Die Knorpelproben wurden vor der Extraktion entweder mit 350 µl Ethanol (Vor Konz. 350 µl, Nach Konz. 350 µl, Knorpeldiscs), oder mit 700 µl Ethanol (Vor Konz. 700 µl, Nach Konz. 700 µl) gefällt. (Vor Konz. 350 µl: n= 6 Proben; Nach Konz. 350 µl: n= 6 Proben; Vor Konz. 700 µl: n= 6 Proben; Nach Konz. 700 µl: n= 6 Proben; Knorpeldiscs: n= 97 Proben).

Extrahierte mRNA-Proben	Mittelwerte [ng/µl] ± Standardfehler
Vor Konz. 350 µl EtOH	0,82 ±0,16
Nach Konz. 350 µl EtOH	3,3 ±0,15
Vor Konz. 700 µl EtOH	1,86 ±1,23
Nach Konz. 700 µl EtOH	7,85 ±0,64
Knorpeldiscs	6,71 ±0,80

6.2 Analyse superfizieller isolierter Chondrozyten auf Mikroadhäsionsflächen

Tabelle 31 Übersicht der analysierten Chondrozyten pro räumliche Organisationsform („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Tabelle zeigt pro räumliche Organisationsform die Anzahl der Chondrozyten, die mit der Software ImageJ bzgl. verschiedener Shape Deskriptoren analysiert wurden, sowie die Anzahl der Patientenproben, aus denen die Chondrozytenproben gewonnen wurden.

Räumliche Organisationsform	Patienten	Chondrozyten
„Strings“	10	1481
„Doublestrings“	5	728
„Small Clusters“	18	549
„Big Clusters“	13	597
„Diffus“	11	839

Tabelle 32 Übersicht über die Mittelwerte der Shape Deskriptoren (Aspect Ratio, Roundness, Solidity, Circularity) in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Doublestrings“, „Small Clusters“, „Big Clusters“, „Diffus“). Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern. („Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Doublestrings“: n= 728 Chondrozyten, „Small Clusters“: n= 549 Chondrozyten, „Big Clusters“: n= 597 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

	Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
„Strings“	1,508 ±0,01	0,697 ±0,004	0,824 ±0,002	0,911 ±0,001
„Doublestrings“	1,478 ±0,011	0,703 ±0,005	0,848 ±0,002	0,920 ±0,001
„Small Clusters“	1,421 ±0,011	0,727 ±0,005	0,844 ±0,003	0,919 ±0,001
„Big Clusters“	1,444 ±0,013	0,722 ±0,006	0,844 ±0,003	0,920 ±0,001
„Diffus“	1,195 ±0,005	0,850 ±0,003	0,888 ±0,001	0,925 ±0,0004

Tabelle 33 Ausprägung de Shape Deskriptor in Abhängigkeit der Zellmorphologie superfizieller Chondrozyten in vivo und auf microengineerten Microadhäsionsflächen. Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte bzgl. der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity von superfiziellen Chondrozyten im Gewebe („Strings“, „Diffus“) sowie von isolierten Chondrozyten auf microengineerten Mikroadhäsionsflächen (H, Crossbow, O, Y – die Bilder stammen aus S. Hermanns Inaugural-Dissertation und durften mit seiner freundlicher Genehmigung zur Auswahl der passenden Mikroadhäsionsflächen für diese Arbeit verwendet werden).

Chondrozyten - Organisationsformen		Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
Räumliche Organisationsformen	„Strings“	1,508	0,697	0,824	0,911
	„Diffus“	1,195	0,850	0,888	0,925
Microengineerte Zellgeometrie	H	1,281	0,781	0,754	0,93
	Crossbow	1,048	0,955	0,674	0,843
	O	1,031	0,970	0,85	0,964
	Y	1,056	0,948	0,4655	0,7365

Tabelle 34 Ausprägung verschiedener Shape Deskriptoren von Chondrozyten verschiedener Isolationsansätze (Isol. aus „Strings“, Isol. aus diffus organisierter Anordnung, Isol. aus Gemisch) bzw. aus definierten räumlichen Organisationsformen („Strings“, „Diffus“). Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern (Isoliert aus „Strings“: n= 110 Chondrozyten, Isoliert aus „Diffus“: n= 140 Chondrozyten, Isoliert aus gemischtem Ansatz: n= 135 Chondrozyten, „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „Diffus“: n= 839 Chondrozyten).

	Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
Aus „Strings“ isoliert	1,142 ±0,014	0,886 ±0,008	0,892 ±0,004	0,924 ±0,001
Aus diffusen Chondrozyten isoliert	1,118 ±0,009	0,901 ±0,006	0,902 ±0,003	0,923 ±0,001
Aus gemischtem Ansatz isoliert	1,111 ±0,007	0,904 ±0,005	0,918 ±0,002	0,940 ±0,001
„Strings“	1,508 ±0,01	0,697 ±0,004	0,824 ±0,002	0,911 ±0,001
„Diffus“	1,195 ±0,005	0,850 ±0,003	0,888 ±0,001	0,925 ±0,0004

Tabelle 35 Ausprägung verschiedener Shape Deskriptoren superfizieller Chondrozyten in einer elliptischen bzw. rundlichen Zellgeometrie. Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler der Shape Deskriptoren Aspect Ratio, Roundness, Circularity und Solidity in Bezug auf elliptische („Strings“, „H-Shape“) und rundliche („Diffus“ und „O-Shape“) Zellgeometrien (Elliptisch: „Strings“: n= 1481 Chondrozyten, „H-Shape“: n= 100 Chondrozyten; rundlich: „Diffus“: n= 839 Chondrozyten, „O-Shape“: n= 146 Chondrozyten).

	Zellgeometrie	Aspect Ratio	Roundness	Circularity	Solidity
„elliptisch“	„Strings“	1,508	0,697	0,824	0,911
		±0,01	±0,004	±0,002	±0,001
	„H-Shape“	1,491	0,690	0,762	0,906
		±0,026	±0,011	±0,009	±0,005
"rund"	„Diffus“	1,195	0,850	0,888	0,925
		±0,005	±0,003	±0,001	±0,0004
	„O-Shape“	1,134	0,888	0,902	0,948
		±0,009	±0,006	±0,003	±0,001

6.3 Relative mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen

Tabelle 36 Paarweise Korrelation der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen (1A2, 2A1, 3A1, 6A1) verschiedener räumlicher Organisationsformen. Eine mögliche Korrelation zwischen den Kollagentypen wurde anhand des Pearson-Produkt-Moment-Tests untersucht. Ein signifikant positiver Korrelationskoeffizient K (mit $p < 0,05$) zeigt an, dass beide untersuchte Kollagene in ihrer Expressionshöhe gemeinsam linear ansteigen. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau kodiert. Nicht signifikante Korrelationen wurden dunkelgrau unterlegt. Weiße Felder wurden nicht bestimmt, da der entsprechende Test in einer anderen Spalte dieser Tabelle aufgeführt wird („Strings“ (alle Kollagene): 17 Proben aus 202 Knorpeldiscs von 29 Patienten; „Doublestrings“: Col1A2 17 Proben aus 232 Knorpeldiscs von 23 Patienten; Col2A1, Col3A1 und Col6A1: 18 Proben aus 246 Knorpeldiscs von 24 Patienten; „Small Clusters“ (alle Kollagene): 18 Proben aus 209 Knorpeldiscs von 28 Patienten; „Big Clusters“ (alle Kollagene): 18 Proben aus 155 Knorpeldiscs von 29 Patienten; „Diffus“ (alle Kollagene): 16 Proben aus 161 Knorpeldiscs von 29 Patienten).

räumliche Organisationsform	Korrelationskoeffizient K und Signifikanzwert p		Col2A1	Col3A1	Col6A1
„Strings“	Col1A2	K p		0,603 0,011	
	Col2A1	K p		0,487 0,047	0,582 0,014
	Col3A1	K p			0,510 0,036
„Doublestrings“	Col1A2	K p			
	Col2A1	K p		0,798 <0,001	
	Col3A1	K p			
„Small Clusters“	Col1A2	K p			
	Col2A1	K p		0,813 <0,001	
	Col3A1	K p			
„Big Clusters“	Col1A2	K p	0,749 <0,001	0,881 <0,001	0,683 0,002
	Col2A1	K p		0,672 0,002	
	Col3A1	K p			0,714 0,001
„Diffus“	Col1A2	K p		0,892 <0,001	
	Col2A1	K p			
	Col3A1	K p			

Tabelle 37 Ausprägung der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagentypen in Bezug auf die microengineerte Zellgeometrie „H-Shape“ und „O-Shape“
 Die Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehler (Col1A2: n= 6 Proben von 6 Patienten, Col2A1: n= 6 Proben von 6 Patienten, Col3A1: n= 6 Proben von 6 Patienten, Col6A1: n= 6 Proben von 6 Patienten).

	Col1A2	Col2A1	Col3A1	Col6A1
„H-Shape“	4,182 ±0,922	0,077 ±0,043	0,358 ±0,077	1,007 ±0,131
„O-Shape“	5,941 ±1,356	0,076 ±0,039	0,447 ±0,117	1,457 ±0,213

7 Literaturverzeichnis

- AICHER, W. K. & ROLAUFFS, B. 2014. The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 73, 645-53.
- AIGNER, T., BERTLING, W., STÖSS, H., WESELOH, G. & VON DER MARK, K. 1993. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 829.
- AIGNER, T., FUNDEL, K., SAAS, J., GEBHARD, P. M., HAAG, J., WEISS, T., ZIEN, A., OBERMAYR, F., ZIMMER, R. & BARTNIK, E. 2006a. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54, 3533-3544.
- AIGNER, T., SACHSE, A., GEBHARD, P. & ROACH, H. 2006b. Osteoarthritis: pathobiology—targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*, 58, 128-149.
- AIGNER, T., STÖß, H., WESELOH, G., ZEILER, G. & VON DER MARK, K. 1992. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Archiv B*, 62, 337.
- AKDAE, A. D. D. Ä.-. 2008. *Arzneiverordnung in der Praxis - Degenerative Gelenkerkrankungen* [Online]. Available: <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/TE/A-Z/PDF/Gelenkerkrankungen.pdf> [Accessed].
- ALTMAN, R., ASCH, E., BLOCH, D., BOLE, G., BORENSTEIN, D., BRANDT, K., CHRISTY, W., COOKE, T., GREENWALD, R. & HOCHBERG, M. 1986. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*, 29, 1039-1049.
- ANGELE, P., AURICH, M., BECHER, C., BODE, G., BRUCKER, P., DIRISAMER, F., ERGGELET, C., FAY, J., FEUCHT, M. & FICKERT, S. 2016. *Knorpeltherapie: Praxisleitfaden der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU*, Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N. & PATEL, H. R. 2014. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., CONRAD, A., ENGELE, J. & KIRSCH, J. 2014. *Duale Reihe Anatomie*, Georg Thieme Verlag.
- AWMF, A. D. W. M. F.-. 2009. *Endoprothese bei Gonarthrose* [Online]. Available: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/012-008_S1_Endoprothese_bei_Gonarthrose_2009_abgelaufen.pdf [Accessed].
- AYDELOTTE, M. B. & KUETTNER, K. E. 1988. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connective tissue research*, 18, 205-222.

- BAYLISS, M. T., VENN, M., MAROUDAS, A. & ALI, S. Y. 1983. Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochemical Journal*, 209, 387-400.
- BEHRENS, P., BOSCH, U., BRUNS, J., ERGGELET, C. A., ESENWEIN, S., GAISSMAIER, C., KRACKHARDT, T., LÖHNERT, J., MARLOVITS, S. & MEENEN, N. 2004. Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 142, 529-539.
- BENNINGHOFF, A. 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Cell and Tissue Research*, 2, 783-862.
- BENYA, P. D., PADILLA, S. R. & NIMNI, M. E. 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15, 1313-1321.
- BENYA, P. D. & SHAFFER, J. D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30, 215-224.
- BERENBAUM, F. 2004. Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 16, 616-622.
- BLAGOJEVIC, M., JINKS, C., JEFFERY, A. & JORDAN, K. 2010. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage*, 18, 24-33.
- BLEß, H.-H. & KIP, M. 2016. *Weißbuch Gelenkersatz - Versorgungssituation bei endoprothetischen Hüft- und Knieoperationen in Deutschland*, Springer Verlag.
- BONASSAR, L. J., FRANK, E. H., MURRAY, J. C., PAGUIO, C. G., MOORE, V. L., LARK, M. W., SANDY, J. D., WU, J. J., EYRE, D. R. & GRODZINSKY, A. J. 1995. Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis & Rheumatism*, 38, 173-183.
- BORZÌ, R. M., MAZZETTI, I., CATTINI, L., UGUCCIONI, M., BAGGIOLINI, M. & FACCHINI, A. 2000. Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis & Rheumatism*, 43, 1734-1741.
- BRIGHTON, C. T., KITAJIMA, T. & HUNT, R. M. 1984. Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 27, 1290-1299.
- BRITTBERG, M. 2000. ICRS Clinical Cartilage Injury Evaluation System. *3rd ICRS Meeting. Göteborg, Sweden*.
- BROOM, N. D. & MARRA, D. L. 1985. New structural concepts of articular cartilage demonstrated with a physical model. *Connective tissue research*, 14, 1-8.
- BUCKWALTER, J. & MANKIN, H. 1997. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons-Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions*†. *J Bone Joint Surg Am*, 79, 600-11.
- BUCKWALTER, J. A. 2002. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, 21-37.

- BURGER, W. & BURGE, M. J. 2006. *Digitale Bilderverarbeitung - Eine Einführung mit Java und ImageJ*, Springer Berlin Heidelberg.
- BURR, D. B. 2004. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 12, 20-30.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W. & SHIPLEY, G. L. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55, 611-622.
- CARON, M. M., EMANS, P. J., COOLSEN, M. M., VOSS, L., SURTEL, D. A., CREMERS, A., VAN RHIJN, L. W. & WELTING, T. J. 2012. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20, 1170-1178.
- CHEN, A., BAE, W., SCHINAGL, R. & SAH, R. 2001. Depth-and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression. *Journal of biomechanics*, 34, 1-12.
- CHEN, C. S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G. M. & INGBER, D. E. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*, 276, 1425-8.
- CLARK, J. M. 1990. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *Journal of anatomy*, 171, 117.
- CLONTECH. 2010. *Advantage RT-for-PCR Kit Users Manual* [Online]. Available: http://www.clontech.com/DE/Products/Real-Time_qPCR_and_Reverse_Transcription/MMLV_RT/cDNA_Synthesis/ibcGetAttachment.jsp?cltemId=17629&fileId=5877908&sitex=10024:22372:US [Accessed 12.09.2016].
- DIAB, M., WU, J.-J. & EYRE, D. R. 1996. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochemical Journal*, 314, 327-332.
- DIMMLER, A., ÖHLER, S., SOEDER, S. & AIGNER, P. D. T. 2005. Knorpelschaden und-regeneration bei Osteoarthrose. *Arthroskopie*, 18, 174-180.
- EGER, W., SCHUMACHER, B. L., MOLLENHAUER, J., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2002. Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences. *J Orthop Res*, 20, 526-34.
- EGGLI, P. S., HUNZINKER, E. B. & SCHENK, R. K. 1988. Quantitation of structural features characterizing weight-and less-weight-bearing regions in articular cartilage: A stereological analysis of medical femoral condyles in young adult rabbits. *The Anatomical Record*, 222, 217-227.
- ENGELHARDT, M. 2003. Epidemiologie der arthrose in westeuropa. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 54, 171-175.
- EYRE, D. 2002. Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4, 30-5.
- FAVERO, M., RAMONDA, R., GOLDRING, M. B., GOLDRING, S. R. & PUNZI, L. 2015. Early knee osteoarthritis. *RMD open*, 1, e000062.
- FELKA, T., ROTHDIENER, M., BAST, S., UYNUK-OOL, T., ZOUHAIR, S., OCHS, B. G., DE ZWART, P., STOECKLE, U., AICHER, W. K., HART,

- M. L., SHIOZAWA, T., GRODZINSKY, A. J., SCHENKE-LAYLAND, K., VENKATESAN, J. K., CUCCHIARINI, M., MADRY, H., KURZ, B. & ROLAUFFS, B. 2016. Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology. *Osteoarthritis Cartilage*.
- FELSON, D. T., LAWRENCE, R. C., DIEPPE, P. A., HIRSCH, R., HELMICK, C. G., JORDAN, J. M., KINGTON, R. S., LANE, N. E., NEVITT, M. C. & ZHANG, Y. 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*, 133, 635-646.
- FITZGERALD, J. B., JIN, M., DEAN, D., WOOD, D. J., ZHENG, M. H. & GRODZINSKY, A. J. 2004. Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19502-19511.
- FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. 1978. Role of cell shape in growth control.
- FUCHS, J., RABENBERG, M. & SCHEIDT-NAVE, C. 2013. Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 56, 678-686.
- FUKUI, N., IKEDA, Y., OHNUKI, T., TANAKA, N., HIKITA, A., MITOMI, H., MORI, T., JUJI, T., KATSURAGAWA, Y., YAMAMOTO, S., SAWABE, M., YAMANE, S., SUZUKI, R., SANDELL, L. J. & OCHI, T. 2008. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum*, 58, 154-63.
- FUSS, M., EHLERS, E.-M., RUSSLIES, M., ROHWEDEL, J. & BEHRENS, P. 2000. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions: a light, scanning and transmission electron microscopy study. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 182, 303-310.
- GAO, L., MCBEATH, R. & CHEN, C. S. 2010. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-Cadherin. *Stem cells*, 28, 564-572.
- GAY, S., MÜLLER, P., LEMMEN, C., REMBERGER, K., MATZEN, K. & KÜHN, K. 1976. Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and degenerative osteoarthrosis. *Klinische Wochenschrift*, 54, 969-976.
- GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55, 1531-1546.
- GEYER, M., GRÄSSEL, S., STRAUB, R., SCHETT, G., DINSER, R., GRIFKA, J., GAY, S., NEUMANN, E. & MÜLLER-LADNER, U. 2009. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17, 328-335.
- GLASER, C. & PUTZ, R. 2002. Functional anatomy of articular cartilage under compressive loading Quantitative aspects of global, local and zonal

- reactions of the collagenous network with respect to the surface integrity. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 83-99.
- GLOWACKI, J., TREPMAN, E. & FOLKMAN, J. 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 172, 93-98.
- GOLDRING, M. B. & GOLDRING, S. R. 2007. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213, 626-34.
- GOLDRING, M. B. & MARCU, K. B. 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 11, 224.
- GRAY, M. L., PIZZANELLI, A. M., GRODZINSKY, A. J. & LEE, R. C. 1988. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *Journal of Orthopaedic Research*, 6, 777-792.
- GUILAK, F., RATCLIFFE, A. & MOW, V. C. 1995. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *Journal of Orthopaedic Research*, 13, 410-421.
- HALDER, G., DUPONT, S. & PICCOLO, S. 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 591-600.
- HAMERMAN, D. & SCHUBERT, M. 1962. Diarthrodial joints, an essay. *The American journal of medicine*, 33, 555-590.
- HARINGMAN, J. J., LUDIKHUIZE, J. & TAK, P. P. 2004. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Annals of the rheumatic diseases*, 63, 1186-1194.
- HAUGLAND, R. P. 2002. *Handbook of fluorescent probes and research products*, Molecular Probes.
- HAYMAN, D. M., BLUMBERG, T. J., SCOTT, C. C. & ATHANASIOU, K. A. 2006. The effects of isolation on chondrocyte gene expression. *Tissue engineering*, 12, 2573-2581.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6, 986-994.
- HERMANN, S. 2017. Understanding osteoarthritis: how do cells lose orientation during proliferation. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- HERMANSSON, M., SAWAJI, Y., BOLTON, M., ALEXANDER, S., WALLACE, A., BEGUM, S., WAIT, R. & SAKLATVALA, J. 2004. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin β A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 43514-43521.
- HORIKAWA, O., NAKAJIMA, H., KIKUCHI, T., ICHIMURA, S., YAMADA, H., FUJIKAWA, K. & TOYAMA, Y. 2004. Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Science*, 9, 29-36.
- HUNZIKER, E. 1992. Articular cartilage structure in human and experimental animals. *Articular cartilage and osteoarthritis*.

- HUNZIKER, E. B. 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and cartilage*, 10, 432-463.
- HUNZIKER, E. B., QUINN, T. M. & HAUSELMANN, H. J. 2002. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 564-72.
- IMAGEJ, H. Available: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html> [Accessed].
- JADIN, K. D., WONG, B. L., BAE, W. C., LI, K. W., WILLIAMSON, A. K., SCHUMACHER, B. L., PRICE, J. H. & SAH, R. L. 2005. Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3D imaging and analysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53, 1109-1119.
- JAY, G. D., TANTRAVAHU, U., BRITT, D. E., BARRACH, H. J. & CHA, C. J. 2001. Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 677-687.
- JONES, C., SMOLINSKI, D., WU, J., WILLERS, C., MILLER, K., KIRK, T. & ZHENG, M. 2004. Quantification of chondrocyte morphology by confocal arthroscopy. *Journal of Musculoskeletal Research*, 8, 145-154.
- JORDAN, K., ARDEN, N., DOHERTY, M., BANNWARTH, B., BIJLSMA, J., DIEPPE, P., GUNTHER, K., HAUSELMANN, H., HERRERO-BEAUMONT, G. & KAKLAMANIS, P. 2003. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Annals of the rheumatic diseases*, 62, 1145-1155.
- JURVELIN, J., MÜLLER, D., WONG, M., STUDER, D., ENGEL, A. & HUNZIKER, E. 1996. Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy. *Journal of structural biology*, 117, 45-54.
- KEAN, W., KEAN, R. & BUCHANAN, W. 2004. Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain. *Inflammopharmacology*, 12, 3-31.
- KIM, A. C. & SPECTOR, M. 2000. Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res*, 18, 749-55.
- KLEIN, T. J., CHAUDHRY, M., BAE, W. C. & SAH, R. L. 2007. Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *Journal of biomechanics*, 40, 182-190.
- KRISHNAN, R., PARK, S., ECKSTEIN, F. & ATESHIAN, G. A. 2003. Inhomogeneous cartilage properties enhance superficial interstitial fluid support and frictional properties, but do not provide a homogeneous state of stress. *Journal of biomechanical engineering*, 125, 569-577.
- KUETTNER, K., AYDELOTTE, M. & THONAR, E. 1991. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 27, 46-48.

- KUETTNER, K. E., PAULI, B. U., GALL, G., MEMOLI, V. A. & SCHENK, R. K. 1982. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *The Journal of cell biology*, 93, 743-750.
- KÜHN, K., MAYNE, R. & BURGESSON, R. 1987. The classical collagens: types I, II, and III. *Structure and Function of Collagen Types*, Eds. R. Mayne and RE Burgesson (Academic Press, London, 1987) p, 5.
- LEE, D. A., NOGUCHI, T., KNIGHT, M. M., O'DONNELL, L., BENTLEY, G. & BADER, D. L. 1998. Response of chondrocyte subpopulations cultured within unloaded and loaded agarose. *Journal of orthopaedic research*, 16, 726-733.
- LEFEBVRE, V., PEETERS-JORIS, C. & VAES, G. 1990. Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the dedifferentiation of articular chondrocytes by serial subcultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1051, 266-275.
- LÖFFLER, G. & PETRIDES, P. E. 2013. *Biochemie und pathobiochemie*, Springer-Verlag.
- LÖHNERT, J., RUHNAU, K., GOSSEN, A., BERNSMANN, K. & WIESE, M. 1999. Autologe chondrozytentransplantation (ACT) im kniegelenk. *Arthroskopie*, 12, 34-42.
- LOTZ, M. K., OTSUKI, S., GROGAN, S. P., SAH, R., TERKELTAUB, R. & D'LIMA, D. 2010. Cartilage cell clusters. *Arthritis & Rheumatism*, 62, 2206-2218.
- LU, X. & MOW, V. 2008. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Medicine+ Science in Sports+ Exercise*, 40, 193.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2012. Taschenlehrbuch Histologie, 4. vollst. überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- MADRY, H., LUYTEN, F. P. & FACCHINI, A. 2012. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20, 407-22.
- MANASEK, F. J., BURNSIDE, M. B. & WATERMAN, R. E. 1972. Myocardial cell shape change as a mechanism of embryonic heart looping. *Dev Biol*, 29, 349-71.
- MANKIN, H. J. & LIPPIELLO, L. 1970. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. *JBJS*, 52, 424-434.
- MANSFIELD, J. C., WINLOVE, C. P., MOGER, J. & MATCHER, S. J. 2008. Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. *Journal of biomedical optics*, 13, 044020-044020-13.
- MARLOVITS, S., HOMBAUER, M., TRUPPE, M., VECSEI, V. & SCHLEGEL, W. 2004. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *Bone & Joint Journal*, 86, 286-295.
- MAROUDAS, A. & VENN, M. 1977. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. II. Swelling. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 36, 399-406.

- MARTEL-PELLETIER, J., BOILEAU, C., PELLETIER, J.-P. & ROUGHLEY, P. J. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22, 351-384.
- MAYNE, R. 1989. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis & Rheumatism*, 32, 241-246.
- MAYNE, R., VAIL, M. S., MAYNE, P. M. & MILLER, E. J. 1976. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73, 1674-1678.
- MILLWARD-SADLER, S. & SALTER, D. M. 2004. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Annals of biomedical engineering*, 32, 435-446.
- MIOSGE, N., HARTMANN, M., MAELICKE, C. & HERKEN, R. 2004. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochemistry and cell biology*, 122, 229-236.
- MIOSGE, N., WALETZKO, K., BODE, C., QUONDAMATTEO, F., SCHULTZ, W. & HERKEN, R. 1998. Light and electron microscopic in situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6, 278-285.
- MITCHELL, N., LEE, E. & SHEPARD, N. 1992. The clones of osteoarthritic cartilage. *Bone & Joint Journal*, 74, 33-38.
- MOLLENHAUER, J. & AURICH, M. 2003. Grundlegendes zum Gelenkknorpel. In: HJ, E. (ed.) *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin.
- MOW, V. C. & HUISKES, R. 2005. *Basic orthopaedic biomechanics & mechano-biology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- MÜLLER, P., LEMMEN, C., GAY, S., GAUSS, V. & KÜHN, K. 1977. Immunochemical and biochemical study of collagen synthesis by chondrocytes in culture. *Experimental cell research*, 108, 47-55.
- MURRAY, D. H., BUSH, P. G., BRENKEL, I. J. & HALL, A. C. 2010. Abnormal human chondrocyte morphology is related to increased levels of cell-associated IL-1beta and disruption to pericellular collagen type VI. *J Orthop Res*, 28, 1507-14.
- MUTHURI, S. G., HUI, M., DOHERTY, M. & ZHANG, W. 2011. What if we prevent obesity? Risk reduction in knee osteoarthritis estimated through a meta-analysis of observational studies. *Arthritis care & research*, 63, 982-990.
- NELSON, C. M., VANDUIJN, M. M., INMAN, J. L., FLETCHER, D. A. & BISSELL, M. J. 2006. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. *Science*, 314, 298-300.
- NIEMEYER, P., ANDEREYA, S., ANGELE, P., ATESCHRANG, A., AURICH, M., BAUMANN, M., BEHRENS, P., BOSCH, U., ERGGELET, C., FICKERT, S., FRITZ, J., GEBHARD, H., GELSE, K., GUNTHER, D., HOBURG, A., KASTEN, P., KOLOMBE, T., MADRY, H., MARLOVITS, S., MEENEN, N. M., MULLER, P. E., NOTH, U., PETERSEN, J. P., PIETSCHMANN, M., RICHTER, W., ROLAUFFS, B., RHUNAU, K.,

- SCHEWE, B., STEINERT, A., STEINWACHS, M. R., WELSCH, G. H., ZINSER, W. & ALBRECHT, D. 2013. [Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: a guideline by the working group "Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (DGOU)]. *Z Orthop Unfall*, 151, 38-47.
- NIEMINEN, M. T., RIEPPO, J., TÖYRÄS, J., HAKUMÄKI, J. M., SILVENNOINEN, J., HYTTINEN, M. M., HELMINEN, H. J. & JURVELIN, J. S. 2001. T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magnetic resonance in medicine*, 46, 487-493.
- NIH ImageJ Download.
- NISHITANI, K., KOBAYASHI, M., KUROKI, H., MORI, K., SHIRAI, T., SATAKE, T., NAKAMURA, S., ARAI, R., NAKAGAWA, Y. & NAKAMURA, T. 2014. Ultrasound can detect macroscopically undetectable changes in osteoarthritis reflecting the superficial histological and biochemical degeneration: ex vivo study of rabbit and human cartilage. *PLoS One*, 9, e89484.
- NOVAKOFSKI, K. D., WILLIAMS, R. M., FORTIER, L. A., MOHAMMED, H. O., ZIPFEL, W. R. & BONASSAR, L. J. 2014. Identification of cartilage injury using quantitative multiphoton microscopy. *Osteoarthritis and cartilage*, 22, 355-362.
- OLIVERIA, S. A., FELSON, D. T., REED, J. I., CIRILLO, P. A. & WALKER, A. M. 1995. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis & Rheumatism*, 38, 1134-1141.
- PADHYE, V. V., YORK, C. & BURKIEWICZ, A. 1997. Nucleic acid purification on silica gel and glass mixtures. Google Patents.
- PALFREY, A. & DAVIES, D. 1966. The fine structure of chondrocytes. *Journal of anatomy*, 100, 213.
- PAUL, J. 1976. Force actions transmitted by joints in the human body. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 192, 163-172.
- PAULSEN, W. 2000. Sobotta, Atlas d. Anatomie d. Menschen.
- POMBO-SUAREZ, M., CALAZA, M., GOMEZ-REINO, J. J. & GONZALEZ, A. 2008. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC molecular biology*, 9, 1.
- POOLE, A. R. 1999. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*, 4, D662-70.
- POOLE, C. A. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 191 (Pt 1), 1-13.
- POOLE, C. A., AYAD, S. & GILBERT, R. T. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science*, 103, 1101-1110.
- POOLE, C. A., AYAD, S. & SCHOFIELD, J. R. 1988. Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular

- capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science*, 90, 635-643.
- QIAGEN. 2012. *RNeasy Mini Handbook* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> [Accessed 07.10.2016].
- QUINN, T. M., HUNZIKER, E. B. & HÄUSELMANN, H.-J. 2005. Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis and cartilage*, 13, 672-678.
- QUINTAVALLA, J., KUMAR, C., DAOUTI, S., SLOSBERG, E. & UZIEL-FUSI, S. 2005. Chondrocyte cluster formation in agarose cultures as a functional assay to identify genes expressed in osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*, 204, 560-566.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2008. Duale Reihe Biochemie. *Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (Autoren)*, 174-176.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT. 2013. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes., Heft 54.
- ROCHE. 2016. *PCR: Eine ausgezeichnete Methode* [Online]. Roche. Available: http://www.roche.com/pcr_d.pdf [Accessed 12.05.2016 2016].
- ROLAUFFS, B., AICHER, W., OCHS, B., BAHRS, C., ALBRECHT, D. & WEISE, K. 2009. Regenerative Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 4, 339-354.
- ROLAUFFS, B., ROTHDIENER, M., BAHRS, C., BADKE, A., WEISE, K., KUETTNER, K. E., KURZ, B., AURICH, M., GRODZINSKY, A. J. & AICHER, W. K. 2011. Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis. *Arthritis Rheum*, 63, 1637-47.
- ROLAUFFS, B., WILLIAMS, J. M., AURICH, M., GRODZINSKY, A. J., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2010. Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 62, 489-98.
- ROLAUFFS, B., WILLIAMS, J. M., GRODZINSKY, A. J., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2008. Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *J Struct Biol*, 162, 335-44.
- ROSSERT, J. A. D. C., BENOIT 2002. Type I collagen: structure, synthesis and regulation, in: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan (Eds.), *Principles in Bone Biology*, Academic Press, Orlando, 2002, pp. 189 – 210.
- SANDELL, L. J. & AIGNER, T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 3, 1.
- SARZI-PUTTINI, P., CIMMINO, M. A., SCARPA, R., CAPORALI, R., PARAZZINI, F., ZANINELLI, A., ATZENI, F. & CANESI, B. 2005. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum*, 35, 1-10.
- SATO, T., KONOMI, K., YAMASAKI, S., ARATANI, S., TSUCHIMOCHI, K., YOKOUCHI, M., MASUKO-HONGO, K., YAGISHITA, N., NAKAMURA, H. & KOMIYA, S. 2006. Comparative analysis of gene expression

- profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 54, 808-817.
- SCHINAGL, R. M., GURSKIS, D., CHEN, A. C. & SAH, R. L. 1997. Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 15, 499-506.
- SCHMID, L. 2016. Implementation und Verifikation einer effizienten, präzisen, reproduzierbaren und akkuraten automatischen Quantifizierungsmethode für zelluläre Morphologien. *Bachelor-Thesis, Universität Tübingen*.
- SCHNABEL, M., MARLOVITS, S., ECKHOFF, G., FICHTEL, I., GOTZEN, L., VECSEI, V. & SCHLEGEL, J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 62-70.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat methods*, 9, 671-675.
- SCHOCHETMAN, G., OU, C.-Y. & JONES, W. K. 1988. Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*, 158, 1154-1157.
- SCHRÖDER, J. 2017. „Kollagen Typ I, II, III und VI - mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen humaner Chondrozyten“. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- SCHUMACHER, B. L., SU, J. L., LINDLEY, K. M., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2002. Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. *The Anatomical Record*, 266, 241-248.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E., SCHUMACHER, U., VOLL, M. & WESKER, K. 2005. PROMETHEUS-Allgemeine Anatomie und Bewegungsapparat. Thieme Verlag, Stuttgart.
- SCOTT, J. 2003. Conn's Biological Stains. A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine. *Journal of Anatomy*, 203, 433-433.
- SHARMA, L., SONG, J., FELSON, D. T., SHAMIYEH, E. & DUNLOP, D. D. 2001. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *Jama*, 286, 188-195.
- SÖDER, S., HAMBACH, L., LISSNER, R., KIRCHNER, T. & AIGNER, T. 2002. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, 10, 464-470.
- SPEKTRUM. 1999. *Fluoreszenzmikroskopie* [Online]. Spektrum. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fluoreszenzmikroskopie/25361> [Accessed 07.10.2016].
- STEWART, M. C., SAUNDERS, K. M., BURTON-WURSTER, N. & MACLEOD, J. N. 2000. 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*, 15, 166-174.
- STOCKWELL, R. 1967. The cell density of human articular and costal cartilage. *Journal of anatomy*, 101, 753.
- STOCKWELL, R. 1971. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *Journal of anatomy*, 109, 411.

- SUN, Y., CHEN, C. S. & FU, J. 2012. Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annu Rev Biophys*, 41, 519-42.
- TEMENOFF, J. S. & MIKOS, A. G. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21, 431-440.
- THERMOSCIENTIFIC 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 Users Manual. In: SCIENTIFIC, T. (ed.).
- VAN DER REST, M. & GARRONE, R. 1991. Collagen family of proteins. *The FASEB journal*, 5, 2814-2823.
- VENN, M. & MAROUDAS, A. 1977. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 36, 121-129.
- VIRÉN, T., SAARAKKALA, S., KALEVA, E., NIEMINEN, H., JURVELIN, J. & TÖYRÄS, J. 2009. Minimally invasive ultrasound method for intra-articular diagnostics of cartilage degeneration. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 35, 1546-1554.
- VON DER MARK, K., GAUSS, V., VON DER MARK, H. & MÜLLER, P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
- WAGNER, M. & SCHABUS, R. 2013. *Funktionelle Anatomie des Kniegelenks*, Springer-Verlag.
- WATT, F. M., JORDAN, P. W. & O'NEILL, C. H. 1988. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 5576-5580.
- WIELAND, H. A., MICHAELIS, M., KIRSCHBAUM, B. J. & RUDOLPHI, K. A. 2005. Osteoarthritis—an untreatable disease? *Nature reviews Drug discovery*, 4, 331-344.
- WIRTZ, D. C. 2010. *AE-Manual der Endoprothetik: Knie*, Springer-Verlag.
- WOOLF, A. D., ERWIN, J. & MARCH, L. 2012. The need to address the burden of musculoskeletal conditions. *Best practice & research Clinical rheumatology*, 26, 183-224.
- WOOLF, A. D. & PFLEGER, B. 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*, 81, 646-56.
- WOTTON, S. & DUANCE, V. 1994. Type III collagen in normal human articular cartilage. *The Histochemical Journal*, 26, 412-416.
- WU, J.-J., WEIS, M. A., KIM, L. S. & EYRE, D. R. 2010. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 18537-18544.
- WU, J., MURRAY, J. & EYRE, D. Evidence for copolymeric cross-linking between types II and III collagens in human articular cartilage. TRANSACTIONS OF THE ANNUAL MEETING-ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY, 1996. ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY, 42-42.
- YANG, Y., RELAN, N. K., PRZYWARA, D. A. & SCHUGER, L. 1999. Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape. *Development*, 126, 3027-33.

- YOUNG, R. D., LAWRENCE, P. A., DUANCE, V. C., AIGNER, T. & MONAGHAN, P. 1995. Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 43, 421-427.
- YOUNG, R. D., LAWRENCE, P. A., DUANCE, V. C., AIGNER, T. & MONAGHAN, P. 2000. Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, 423-432.
- ZHANG, W., DOHERTY, M., PEAT, G., BIERMA-ZEINSTRA, S. M., ARDEN, N., BRESNIHAN, B., HERRERO-BEAUMONT, G., KIRSCHNER, S., LEEB, B. & LOHMANDER, L. 2009. EULAR evidence based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der BG Unfallklinik im Sigfried-Weller-Institut unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs [habilitierter Betreuer]. unter Mitarbeit von mir [Franziska Buck, Doktorandin].

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch die Kollegen der Arbeitsgruppe Jan Schröder, Sina Bast und Tatiana Uynuk-Ool) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Grafiken in Kapitel 2.2.6.2 wurden von Laura Schmid gestaltet und ausgewertet und mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Ebenfalls stammt der inhaltliche Kontext aus den Kapiteln 2.2.6 und 2.2.6.2 aus der Bachelorarbeit von Laura Schmid mit dem Titel „Implementation und Verifikation einer effizienten, präzisen, reproduzierbaren und akkuraten automatischen Quantifizierungsmethode für zelluläre Morphologien“.

Die Verdünnungsreihen für die Effizienzen der qRT-PCR wurden von Jan Schröder erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich mit Rücksprache von Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08.07.2019

Franziska Karoline Schopf, geb. Buck