

**Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
Klinik für Unfallchirurgie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Weise**

**Spender- und kulturabhängige Expression
knorpelrelevanter Markergene
humaner artikulärer Chondrozyten**

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

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

**vorgelegt von
Thomas Hartmann Würz,
aus
Esslingen am Neckar**

2006

Dekan: **Professor Dr. C. D. Claussen**

1. Berichterstatter: **Professor Dr. K. Weise**

2. Berichterstatter: **Professor Dr. T. Sktuella**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Biologie des Gelenkknorpels	9
1.2. Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels	10
1.3. Bedeutung mito- und morphogener Wachstumsfaktoren für den Knorpelstoffwechsel	11
1.3.1. Die Transforming Growth Factor- β -Superfamilie	12
1.3.2. Transforming Growth Factor- β	12
1.3.3. Bone Morphogenetic Protein (BMP)	13
1.3.4. Growth and Differentiating Factor-5 (GDF-5)	14
1.3.5. Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	15
1.3.6. Insuline-like Growth Factor-I und -II (IGF-I und II)	16
1.4. Architektur des Gelenkknorpels	17
1.5. Ätiologie und Pathomechanismen von Gelenkknorpeldefekten	19
1.6. Therapie von Gelenkknorpeldefekten	20
1.6.1. Die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)	21
1.6.2. Dedifferenzierung artikulärer Chondrozyten durch Zellexpansion	23

1.7. Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Humanes Biopsiematerial	25
2.1.2. Chemikalien, Reagenzien, Medien und Primer	26
2.1.2.1. Chondrozytenisolation	26
2.1.2.2. Kulturmedium	26
2.1.2.3. RNA-Extraktion	26
2.1.2.4. Umschreibung in cDNA	27
2.1.2.5. RT-PCR	27
2.1.2.5.1. Master Mix	27
2.1.2.5.2. Primer	28
2.1.2.6. Quantitative PCR mit LightCycler	29
2.1.2.7. Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	30
2.1.2.8. Geräte und Gebrauchsmaterialien	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Zellkultur	31

2.2.1.1. Chondrozytenisolation	31
2.2.1.2. Kultivieren von Chondrozyten	32
2.2.1.3. Zweidimensionale Zellkultur	33
2.2.1.4. Kultivieren von Chondrozyten in Alginatebeads	33
2.2.1.4.1. Herstellung einer Alginatelösung	33
2.2.1.4.2. Ansetzen einer Beadskultur	34
2.2.1.4.3. Auflösen der Beads	34
2.2.2. RNA Isolation	34
2.2.2.1. Zellyse	34
2.2.2.2. Waschen	35
2.2.2.3. Eluierung der RNA	36
2.2.2.4. OD-Vermessung der RNA mit GeneQuant	36
2.2.3. Reverse Transkription	36
2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.2.5. Quantitative Expressionsanalyse mit LightCycler	38
2.2.6. Gelelektrophorese	40
2.2.7. Immunfluoreszenzfärbung	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Spenderabhängiges Expressionsverhalten	42

3.2.	Mikroskopische Kulturanalyse	42
3.2.1.	Frisch isolierte Chondrozyten	42
3.2.2.	Kultivierung in Monolayerkultur	43
3.2.3.	Kultivierung in Alginat	44
3.3.	Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung	44
3.3.1.	Primärkultur	44
3.3.2.	Monolayerkultur	45
3.3.3.	Alginatkultur	46
3.4.	Semiquantitative Analyse der Transkription des kartilaginären Matrixprotein Kollagen-Typ-II in Abhängigkeit von verschiedenen Zellkulturpassagen	46
3.5.	Quantitative Analyse der Transkription des kartilaginären Matrixprotein Kollagen-Typ-II in Abhängigkeit von zunehmender Subkultivierung	47
3.6.	Semiquantitative Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren	48
3.7.	Vergleich der quantitativen Expression von Kollagen- Typ-II in Monolayer- und Alginatkultur	51
3.8.	Vergleich der quantitativen Expression von BMP-2 in Monolayer- und Alginatkultur	52

3.9. Vergleich der quantitativen Expression von GDF-5 in Monolayer- und Alginatkultur	53
4. Diskussion	54
4.1. Diskussion der Methoden	54
4.1.1. Zellkultur	54
4.1.2. Primärkultur	55
4.1.3. Monolayerkultur	56
4.1.4. Kultur in Alginatbeads	57
4.1.5. RNA Extraktion	59
4.1.6. Synthese der cDNA	61
4.1.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)	61
4.1.8. Gelelektrophorese	63
4.2. Diskussion der Ergebnisse	64
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Danksagung	77
8. Lebenslauf	78

1. Einleitung

Verletzungen des hyalinen Gelenkknorpels stellen nach wie vor ein großes Problem im klinischen Alltag dar. Sein eingeschränktes Heilungsvermögen ist durch seine außergewöhnliche Struktur und Anatomie begründet. Der bradytrophe Gelenkknorpel ist nicht durchblutet. Seine Ernährung erfolgt durch Diffusion über die synoviale Gelenkflüssigkeit. Er weist keinen unmittelbaren Anschluss an das lymphatische oder das neuronale System auf. Die hochspezialisierten Chondrozyten sind in der kompakten extrazellulären Matrix des Knorpels weitgehend „eingemauert“ und dadurch immobilisiert.

Der zellarme hyaline Gelenkknorpel besitzt nach dem Schluss der Wachstumsfugen keinen direkten Zugang zu gewebsspezifischen Stammzellpopulationen. Nach seiner Verletzung bleiben daher in der Regel Immigrationsprozesse und Vermehrungsschritte von spezialisierten Vorläuferzellen in der Defektzone aus. Das Fehlen dieses wichtigen und frühen Teils einer intrinsischen Regenerationsantwort führt wiederum, abhängig von der Art und dem Ausmaß der Gelenkschädigung, entweder zu einem vollständigen Ausbleiben der Defektauffüllung oder zu einer Auffüllung mit fibrösem Ersatzgewebe^{1 2}. Die Lebensdauer dieses biomechanisch minderwertigen Narbengewebes ist stark reduziert³. Ein Schaden an der Gelenkoberfläche, vor allem im Bereich der Belastungszone der Gelenkflächen, birgt daher ein erhöhtes Risiko eine weitergehende Gelenkschädigung im Sinne einer frühzeitigen Arthrose nach sich zu ziehen⁴.

Einen Goldstandard für die Therapie artikulärer Knorpeldefekte, wie er derzeit z.B. mit der Transplantation autologer Spongiosa für größere Knochendefekte existiert, gibt es nicht. Die derzeit im klinischen Alltag eingesetzten Verfahren mit biologisch rekonstruktiver Zielsetzung, wie z.B. die Mikrofrakturierung oder die Mosaikplastik, besitzen ein begrenztes Indikationsspektrum und sind nur für kleinere bis mittlere Knorpelschäden bis zu einer Defektgröße von ungefähr 4 cm² geeignet. Außerdem entsteht im Defektareal durch die obengenannten Verfahren bestenfalls eine Art Mischknorpel, bestehend aus hyalinen- und faserartigen Knorpelanteilen.

Die Erkenntnis von Hunter⁵ aus der Mitte des 18. Jahrhundert – „ulcerated cartilage is a troublesome thing; once destroyed, it is not repaired“ - hat deshalb bis zum heutigen Tag Gültigkeit. Trotz weiterentwickelter invasiver und nicht invasiver Behandlungskonzepte ist die biologische Rekonstruktion des defekten Gelenkknorpels im Sinne der restitutio ad integrum auch im beginnenden 21. Jahrhundert immer noch nicht möglich. Die Verfügbarkeit neuer biotechnologischer Verfahren hat daher in jüngster Vergangenheit wieder zu großen wissenschaftlichen Anstrengungen und berechtigten Hoffnungen geführt, diesen therapeutischen Missstand beheben zu können.

Im Hinblick auf die hohe Prävalenz von Gelenkknorpeldefekten und der damit verbundenen Folgeschäden, vor allem der vorzeitigen Arthrose, lässt sich die immense Bedeutung neuer Therapiemöglichkeiten erahnen. Die Einschränkung der Mobilität durch Knorpelschäden und Arthrose hat eine erhebliche Abnahme der Lebensqualität zur Folge. Eine eventuell einhergehende Verminderung der Produktivität im Berufsleben, damit verbundene Folgekosten und Kosten der Therapie verdeutlichen auch die wirtschaftliche Dimension artikulärer Knorpeldefekte. Zusammen mit der demographischen Entwicklung, der fortschreitenden Überalterung in den Industrienationen und der damit zunehmenden Prävalenz altersbedingter Arthrosen, ergibt sich hieraus auch ein Problem von großer sozioökonomischer Bedeutung⁶.

1.1. Biologie des Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel ermöglicht ein nahezu reibungsloses Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen und eine optimale Verteilung der einwirkenden Kräfte auf die Gelenkfläche und das angrenzende Skelettsystem. Die spezifischen Eigenschaften des Gelenkknorpels ermöglichen im Idealfall eine lebenslange Funktion der Gelenke. Intakter Knorpel toleriert die enormen Kompressionen und Scherkräfte, denen er im Laufe eines Lebens ausgesetzt ist. Die Matrix und die in ihr liegenden hochspezialisierten Zellen des

Gelenkknorpels stehen in einem steten symbiotischen Wechselspiel. So produzieren die Chondrozyten zwar die Matrix, jedoch hat diese wiederum einen direkten Einfluss auf deren Funktion und metabolische Aktivität.

Veränderungen der mechanischen Belastung oder des chemischen Milieus im Gelenk bewirken eine Veränderung der synthetischen Funktion der Chondrozyten oder können sie auch direkt schädigen^{7 8 9 10 11}.

Die Chondrozyten stehen mit der sie ernährenden synovialen Gelenkflüssigkeit durch Diffusion in einer stetigen wechselseitigen Kommunikation, die unter anderem durch diverse Signalstoffe, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Botenstoffe vermittelt wird.

Mechanisch wird die Diffusion durch Kompression der Synovialflüssigkeit bei der Bewegung der Gelenke unterstützt. Die Diffusion wird aber auch durch die viskoelastischen Eigenschaften des Gelenkknorpels beeinflusst. Dies kann einer der Gründe dafür sein, dass gebildetes Ersatzgewebe, mit seinen im Vergleich zu gesundem Gelenkknorpel reduzierten biomechanischen Eigenschaften, eine geringere Diffusion beziehungsweise eine minderwertige Ernährung erhält, was wiederum zur vorzeitigen Degeneration des Ersatzgewebes führen kann.

1.2. Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels

Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels besteht im wesentlichen aus Kollagenen und Proteoglykanen, wobei Kollagen vom Typ-II 90 bis 95 % des Gesamtkollagengehalts beträgt. Das feinfibrilläre Kollagen-Typ-II verleiht dem Knorpel Struktur und Festigkeit. Die Proteoglykane liegen entweder als Monomere oder als Aggregate vor, die über spezielle Verbindungsproteine mit den Filamenten der Hyaluronsäure verbunden sind. Einen hohen Stellenwert für die funktionellen Anforderungen an das Knorpelgewebe hat das große Proteoglykan Aggrekan.

Die Monomere der Proteoglykane bestehen aus einem zentralen Kernprotein an das mehrere sulfatierte Glykosaminoglykane gebunden sind. Die

Glykosaminoglykanseitenketten besitzen eine Vielzahl von negativen Ladungen. Durch die hohe Konzentration an anionischen Ladungen sind sie hydrophil und binden Kationen. Die Gleichartigkeit der Ladungen bewirkt ein gegenseitiges Abstoßen der Seitenketten. Dies sichert einen Zustand der räumlichen Ausdehnung der Moleküle.

Gelöste Proteoglykane beanspruchen ein viel größeres Volumen als Proteoglykane, die in der gewebsspezifischen Matrix des Gelenkknorpels gebunden sind¹².

Der natürliche Schwellungsdruck gelöster Proteoglykane wird durch ein sie umgebendes und durchdringendes Netzwerk aus Kollagenfibrillen begrenzt. Die solchermaßen eingeschränkte Expansionsfähigkeit matrixgebundener Proteoglykane hat zur Folge, dass sie sich nicht mit Flüssigkeit sättigen können. Somit besteht ein stetiges Bestreben nach Expansion durch Retraktion von Flüssigkeit¹³. Ein großer Teil der Widerstandsfähigkeit gegen Kompression beruht somit auf der räumlich engen Anordnung an negativen Ladungen, deren gegenseitiger Abstoßung und einem mit diesem Zustand einhergehenden hohen osmotischen Druck¹⁴.

1.3. Bedeutung mito- und morphogener Wachstumsfaktoren für den Knorpelstoffwechsel

Neben der Interaktion mit ihrer extrazellulären Matrix wird die Stoffwechselleistung von artikulären Chondrozyten auch von unterschiedlichen mito- und morphogenen Wachstumsfaktoren beeinflusst, die sie zum Teil selber produzieren. Von besonderer Relevanz hierbei, sind die folgenden bekannten Faktoren.

1.3.1. Die Transforming Growth Factor- β -Superfamilie

Zu diesen werden TGF β -1, -2, -3, die knochenspezifischen morphogenetischen Proteine (BMP) und als Untergruppe der BMP, der Wachstums- und Differenzierungsfaktor-5 (auch bekannt als Cartilage-derived morphogenetic protein-1) gezählt.

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie scheinen eine zentrale Rolle bei der Signalmodulation von Differenzierungsprozessen bei Chondrozyten einzunehmen. Es gilt als sicher, dass TGF- β und BMPs den Differenzierungsprozess von der Vorläuferzelle zum differenzierten matrixbildenden Chondrozyten im Zusammenspiel mit lokalen gewebsspezifischen, mechanischen und systemischen Einflüssen wesentlich beeinflussen.

1.3.2. Transforming Growth Factor- β

Die Untersuchung der Genexpression der verschiedenen Isoformen von TGF β (1,2,3) waren Bestandteil der vorliegenden Untersuchungen, da diese Faktoren nicht nur in der Entwicklung des embryonalen Knorpels von Bedeutung sind¹⁵, sondern vor allem, weil sie auch maßgeblich an der Regulation des Metabolismus von differenzierten Chondrozyten im adulten Organismus beteiligt sind. Die drei Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihres Einflusses auf die Genexpression. TGF- β 1 und -2 induzieren sich gegenseitig. TGF- β 3 hingegen erhöht die Produktion von TGF- β 1 mRNA, hat aber keinen Effekt auf die mRNA von TGF- β 2. Die Expression von TGF- β wird durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren reguliert. Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) erhöht beispielsweise die Produktion von mRNA für TGF- β 1 und -2 mit nachfolgender Erhöhung der korrespondierenden Proteinproduktion¹⁶.

Gemeinsam ist den Isoformen der ausgeprägte mitogene Effekt auf Chondrozyten in der Zellkultur. Als wahrscheinlicher Mediator für die Mitogenität gilt Connective Tissue Growth Factor“ (CTGF)¹⁷. Der Wirkungsgrad der

Isoformen auf die in vitro kultivierten Chondrozyten hängt jedoch stark vom Zeitpunkt ihrer jeweiligen Applikation, bzw. vom Differenzierungszustand der Zellen ab¹⁸.

TGF- β spielt eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung von verschiedenen Geweben, nicht nur für Knorpelgewebe. So beeinflusst er auch maßgeblich den Differenzierungsprozess von Knochengewebe, Nervengewebe, Endothelium und von Zellen des hämatopoetischen Systems. Der Eingriff in diesen Prozess beginnt bereits auf der Stufe von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark¹⁹.

Im Knorpelgewebe besitzt dieser Wachstumsfaktor bereits bei der embryonalen Entwicklung eine wichtige Funktion. Das Vorkommen von mRNA dieses Faktors in den Wachstumsplatten von humanen fötalen Röhrenknochen deutet auf seine frühzeitige Einflussnahme auf das Wachstum des Skelettsystem und des Knorpelgewebes hin²⁰. Im adulten, differenzierten Knorpelgewebe wirkt TGF- β mitogen und regt die Matrixsynthese der Zellen an. Weiterhin konnte im Zusammenspiel mit dem Gewebsinhibitor der Metalloproteinase-1 (TIMP-1) ein chondroprotektiver Effekt nachgewiesen werden²¹.

In einer anderen Studie wurde anhand eines Tiermodells die Auswirkungen einer direkten Injektion von TGF- β 1 und BMP-2 in Kniegelenke untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß TGF- β eine länger andauernde Steigerung der Proteoglykansynthese und des Proteoglykan-Gehaltes im Knorpelgewebe bewirken konnte, als BMP-2²².

1.3.3. Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die BMPs sind Bestandteil der TGF- β -Superfamilie. Als solche teilen sie sich prinzipiell denselben intrazellulären Signaltransduktionsweg²³. Der Unterschied liegt hierbei in spezifischen Rezeptoren für die BMPs und spezifischen R-Smads.

Als Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind die BMPs maßgeblich an der embryonalen Entwicklung des Skeletts beteiligt. Durch ihre Eigenschaft, in die Knochenentwicklung steuernd einzugreifen und endochondrale Ossifikation in vivo zu induzieren²⁴, könnte ihnen eine klinische Bedeutung zur Verbesserung der Frakturheilung zukommen.

Aber auch bei der Chondrogenese übernehmen die BMPs eine aktive Rolle. Anhand eines Tiermodells konnte gezeigt werden, daß BMP-2 im mesenchymalen Bindegewebe, welches den frühen kondensierenden Knorpel umgibt, exprimiert wird. BMP-4 hingegen wird im Perichondrium des sich entwickelnden Knorpels gebildet²⁵. Die gleiche Studie konnte durch eine örtliche Überexpression dieser Faktoren mittels retroviraler Applikation eine Zunahme an extrazellulärer Matrix und an der Chondrozytenzahl nachweisen.

Abgesehen von dem positiven Einfluss auf die Matrixsynthese bewirkt BMP-2 auch eine Stabilisierung des Phänotyps von artikulären Chondrozyten in der Langzeit-Monolayerkultur.¹⁰³ Diese Stabilisierung ist allerdings wie in einer Studie an der Chondrozyten Zelllinie MC 615 gezeigt wurde, nicht uneingeschränkt zu beobachten. Vielmehr ist sie konzentrationsabhängig. Ab einer gewissen Konzentration überwiegen Effekte, die eine Verringerung der Genexpression von Kollagen-Typ-II als Marker für den Phänotyp bewirken²⁶. Eine weitere Untersuchung der Wirkung von BMP-2 in verschiedenen Kulturmodellen konnte außerdem zeigen, dass die Stabilisierung des Phänotyps von zusätzlichen Faktoren wie Oberflächenkontakt, Zellform und zytoskelettärer Strukturierung der Knorpelzellen abhängig ist²⁷.

1.3.4. Growth and Differentiating Factor- 5 (GDF-5)

Dieser Wachstums- und Differenzierungsfaktor, ein Mitglied der BMP-Familie, ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der Skelettentwicklung, insbesondere für die Differenzierung und Steuerung der Entwicklung von Gelenken. Er ist in der Lage, das Wachstum und die Differenzierung von Knorpelgewebe zu stimulieren²⁸. Seine Fähigkeit ektopes Knorpelgewebe zu induzieren, konnte

ebenfalls nachgewiesen werden²⁹. Die stimulierende Wirkung ist allerdings abhängig vom Entwicklungsstadium des Knorpelgewebes. So konnte gezeigt werden, dass exogen appliziertes GDF-5-Protein nur passager das Wachstum und die Differenzierung stimuliert. Diese stadienabhängige Stimulierung konnte ebenso bei der TGF- β induzierten Chondrogenese³⁰ und bei den Effekten von BMP-2 auf die digitale Entwicklung³¹ nachgewiesen werden. GDF-5 stimuliert die Chondrogenese dosisabhängig. Eine Steigerung der Proliferation von Knorpelzellen wurde nur in reiferen Stufen der Skelettentwicklung beobachtet³². Der intrazelluläre Signalweg von GDF-5 entspricht dem der BMP's. Außerdem besteht eine Affinität von GDF-5 zu den BMP Rezeptoren Typ IB und Typ II, sowie in geringerer Ausprägung zu Typ IA³³.

1.3.5. Connective Tissue Growth Factor (CTGF)

Connective Tissue Growth Factor ist ein Cystein-reiches, Heparin-bindendes Protein. Das für dieses Protein kodierende Gen gehört zu der CCN-Familie und ist ein „immediate early“ Gen. Zu dieser Familie zählen die drei Mitglieder *cef10/cyr61*, *ctgf/fisp-12* und *nov*. Die CCN-Proteine zeichnen sich durch eine Homologie der Aminosäuresequenz in Höhe von ungefähr 60%, durch ein Sekretionssignal und eine Konservierung von 38 Cystein-Resten aus³⁴.

Die biologischen Funktionen der Mitglieder der CCN-Familie reichen von der Regulation der Zellproliferation³⁵, Differenzierung, Wundheilung³⁶ bis hin zur Inhibition von Tumorwachstum³⁷.

CTGF übt *in vitro* eine mitogene Wirkung auf Fibroblasten aus. Seine Expression kann in humanen Fibroblasten durch TGF- β induziert werden³⁸. Neben seiner Wirkung als downstream Mediator für die TGF- β induzierte Proliferation von Fibroblasten konnte diesem Protein auch eine vermittelnde Rolle der induzierenden Wirkung von TGF- β auf die Kollagensynthese von Fibroblasten nachgewiesen werden. In einem *in vitro* Modell mit NRK (normal rat kidney)- Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass CTGF die Kollagensynthese stark erhöht. Eine Transfektion mit antisense CTGF-Gen

fürhte zu einem Erlöschen der TGF- β stimulierten Kollagensynthese. Weiterhin führten spezifische anti-CTGF Antikörper zu einem Erlöschen der TGF- β -Wirkung auf die Syntheseleistung von NRK- und humanen Vorhautfibroblasten³⁹. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration hat eine Unterdrückung der CTGF-Genexpression zur Folge und ruft den gleichen Effekt hervor⁴⁰.

CTGF-mRNA wird in vitro in Knorpelzellen exprimiert, wobei die Expression in hypertrophierenden Chondrozyten des Knorpelgewebes am höchsten ist. Durch Zugabe von TGF- β oder BMP-2 wird CTGF-Expression induziert. Diese Beobachtung deutet auf eine zentrale Rolle von CTGF im Differenzierungsprozess von Knorpelzellen hin⁴¹. Weiterhin konnte anhand der chondrozytären Zelllinie HCS-2/8 mittels strahlungsmarkiertem rekombinanten CTGF als Liganden ein spezifischer CTGF-Rezeptor in Knorpelzellen nachgewiesen werden⁴².

1.3.6. Insuline-like Growth Factor-I und -II (IGF-I und -II)

Beide Faktoren wirken mitogen und steigernd auf die Matrixsynthese von Knorpelzellen⁴³. Zusätzlich hemmt IGF-I den Chondrozyten vermittelten Matrixkatabolismus und verbessert die begrenzten Reparaturmechanismen des ständig im Umbau befindlichen Gelenkknorpels⁴⁴. Die Speicherung von IGF-I in der territorialen Matrix von Knorpelgewebe stellt ein konstantes Reservoir zur Verfügung. Eine lokale Steigerung der Matrixsynthese bei begrenzten Matrixschäden könnte auf eine Aktivierung dieser lokalen Speicher zurückzuführen sein. Eine Insuffizienz dieses lokalen Reparatursystem kann zu fortschreitenden degenerativen Veränderungen führen⁴⁵.

Insbesondere für IGF-I wurde im Tiermodell eine stark stimulierende Wirkung auf die Bildung von qualitativ hochwertigen Proteoglykanen nachgewiesen. Histologisch konnte in der perizellulären Matrix von Zellkulturen, die mit rekombinanten IGF-I behandelt waren, eine dosisabhängige Zunahme der Ablagerung von qualitativ hochwertigen Proteoglykanen gezeigt werden⁴⁶.

IGF-I und IGF-II bewirken in vitro bei Chondrozyten durch autokrine Regulation eine Erhöhung ihrer Überlebensrate in Langzeitzellkultur. Die Zugabe neutralisierender Antikörper gegen die Rezeptoren von IGF-I und -II führte in einem Zellkulturmodell zu einer signifikanten Reduzierung der Überlebensrate⁴⁷. Wichtige Kontrollfaktoren der biologischen Aktivität von IGF-I und -II sind die IGF bindenden Proteine IGFBP. Diese Proteine greifen als Biomodulatoren in die Signaltransduktion der beiden IGFs ein. Insbesondere IGFBP 3 und 4 scheinen von den bisher sieben bekannten IGFBPs bei arthrotischen Prozessen eine wichtige Funktion zu besitzen. Durch kompetitive Hemmung schwächen die IGFBPs die Wirkung von IGF-I ab⁴⁸.

Die mitogene und Matrixsynthese stimulierende Wirkung von IGF-I und -II wird durch ein fein abgestimmtes System von IGFBPs moduliert. Eine Fehlregulation dieses Systems kann zu einer Beeinträchtigung der Integrität des Knorpelgewebes führen.

1.4. Architektur des Gelenkknorpels

Obwohl makroskopisch von einheitlichem Aufbau, besitzt der Gelenkknorpel bei mikroskopischer Betrachtung einen gegliederten Aufbau. Diese Strukturierung findet man in zweierlei Hinsicht, zum einen unterscheidet sich die qualitative und strukturelle Zusammensetzung der Matrix entsprechend ihres Abstandes zur Gelenkoberfläche, zum anderen bestehen schichttypische Unterschiede in Bezug auf den Abstand der einzelnen Chondrozyten untereinander.

Nimmt man eine vertikale Einteilung in Abhängigkeit von der Gelenkoberfläche vor, so kann in eine oberflächliche, eine mittlere und eine tiefe Zone unterteilt werden.

Die Chondrozyten der verschiedenen Schichten unterscheiden sich in ihrer Größe, Form und metabolischen Aktivität⁴⁹.

Die oberflächliche Schicht bildet als dünnste die Gleitfläche zum Gelenk. Dünne Kollagenfibrillen verlaufen hier parallel zur Oberfläche. Die Chondrozyten sind länglich und metabolisch wenig aktiv. Deutlich dicker ist die mittlere Zone. Die

Chondrozyten sind hier rundlich und die kräftigeren Kollagenfibrillen räumlich netzartig strukturiert. Hier findet reger Stoffwechsel statt. In der tiefen Zone haben die Chondrozyten eine kugelige Form und säulenartige Anordnung. Die Kollagenfibrillen verlaufen hier den Zellsäulen vergleichbar, senkrecht zur Gelenkoberfläche. An die tiefe Zone schließt sich die Zone des mineralisierten Knorpels an, der als Bindeglied und Verankerungspunkt zum subchondralen Knochen dient.

Die Fixierung wird durch die vertikalen Verankerungen der Kollagenfibrillen erreicht. In Abhängigkeit von der Entfernung zur Zelle unterscheidet sich die Zusammensetzung und der Gehalt an Kollagenen, Proteoglykanen und Wasser⁵⁰. In der nächsten Umgebung der Zellen, dem perizellulären Raum, ist wenig Kollagen vorhanden, dafür aber reichlich Proteoglykan. Der anschließende Bereich der territorialen Matrix besteht überwiegend aus einem Netz dünner Kollagenfibrillen.

Die territoriale Matrix wird vom Bereich der interterritorialen Matrix umgeben. Die interterritoriale Matrix besteht aus großen Kollagenfibrillen, die als größter Bereich des Knorpelgewebes seine speziellen mechanischen Eigenschaften ermöglichen. Die Orientierung der Kollagenfibrillen richtet sich grundsätzlich nach der jeweiligen Zone in der sie sich befinden.

Dieser komplexe Aufbau des Knorpelgewebes mit dem Ergebnis einzigartiger mechanischer Eigenschaften wird von den Chondrozyten ermöglicht. Diese produzieren je nach ihrer Position in der dreidimensionalen Matrix das benötigte Gewebe. Ein künstlich hergestelltes oder durch Transplantation von Zellen oder Gewebe regeneriertes Gelenkknorpelgewebe müsste idealerweise ebenfalls diese komplizierte Struktur aufweisen, um auf Dauer den enormen mechanischen Belastungen ohne Ermüdung standzuhalten.

1.5. Ätiologie und Pathomechanismen von Gelenkknorpeldefekten

Der hyaline Gelenkknorpel ist in seiner Funktion als Gleitfläche für eine normale Gelenkfunktion von entscheidender Bedeutung. Wird seine Integrität verletzt, hat dies weitreichende Folgen.

Für die Therapie von Gelenkknorpeldefekten sind Lokalisation und Ausmaß des Defektes von entscheidender Bedeutung. Bleibt im Umfeld der Destruktion eine ausreichende Knorpelschicht erhalten, sind die Folgen für die Gelenkbeweglichkeit initial häufig gering. Der Patient wird jedoch im weiteren Verlauf, vor allem nach körperlicher Belastung, über rezidivierende Schmerzen klagen.

Grundsätzlich müssen zwei Arten artikulärer Knorpeldefekte unterschieden werden. Zum einen Verletzungen, die lediglich die gelenküberziehende Knorpelschicht (sog. partielle Defekte) betreffen, zum anderen solche, die auch die subchondrale Knochenplatte einschließen (sog. vollschichtige Defekte).

Partielle Defekte bewirken nur eine geringfügige Reaktion im angrenzenden Knorpelgewebe. Kurzfristig kann mitotische Aktivität und ein erhöhter Matrixumsatz bei oberflächlich liegenden Chondrozyten im Defektareal beobachtet werden.

Da jedoch wegen der begrenzten Defekttiefe kein direkter Zugang zur subchondralen Knochenplatte entstanden ist, kann aus dem knöchernen Markraum keine Einblutung und damit kein Einwandern mesenchymaler Vorläuferzellen in die Defektkammer erfolgen. Dies erklärt, warum es bei fehlender Penetration der subchondralen Knochenlamelle zu keiner Bildung eines Fibrinpfropfes und zu keiner Migration potentiell reparativer Zellen kommt. Als häufige Folge bleiben beim Erwachsenen Defektauffüllung bzw. Knorpelheilung vollständig aus^{51 52}. Das äußere Erscheinungsbild einer solchen Defektsituation kann über Monate unverändert bleiben.⁵³ Diese limitierten Knorpeldefekte des Erwachsenen gleichen in ihrem Erscheinungsbild mittelfristig häufig den Frühstadien der Osteoarthrose⁵⁴. Bei Kindern und Jugendlichen kann allerdings, bei noch offener Wachstumsfuge oder

Mitbeteiligung der Knochenlammelle, häufig auch eine qualitativ hochwertige Knorpelregeneration in der Defektzone beobachtet werden⁵⁵.

Im Gegensatz zu partiellen Defekten kann bei vollschichtigen Defekten auch beim Erwachsenen ein Einwandern mesenchymaler Zellen mit konsekutiver Knorpelbildung stattfinden⁵⁶.

Dieses Knorpelgewebe gleicht jedoch meist nicht dem ursprünglichen hyalinen Gelenkknorpel, sondern es ist eine Art Faserknorpel, dessen kollagener Anteil überwiegend aus Typ-I-Kollagen besteht. Das entstandene Narbengewebe, mit seiner schlechteren funktionellen Qualität, genügt den gelenkspezifischen biomechanischen Anforderungen langfristig meist nicht⁵⁷. Häufig unterliegt das biomechanisch insuffiziente Regenerat bereits frühzeitig einem fortschreitenden degenerativen Prozess⁵⁸.

Von Bedeutung für die weitere Gelenkhomöostase scheint auch die unvollständige Integration des Ersatzgewebes in das umgebende native Knorpelgewebe zu sein.

Die Kollagenfasern der beiden Gewebe verbinden und durchflechten sich nicht. Dies liegt wahrscheinlich in erster Linie an den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix, von denen bekannt ist, dass sie anti-adhäsive Eigenschaften besitzen⁵⁹. Der Prozess der spontanen Heilung bildet jedoch, trotz seiner unbefriedigenden Ergebnisse⁶⁰ bezüglich der qualitativen Gewebsregeneration, die Ausgangsbasis vieler Therapieansätze⁶¹.

1.6. Therapie von Gelenkknorpeldefekten

Grundsätzlich muss vor der Betrachtung der vielfältigen Therapieansätze mit biologisch rekonstruktiver Zielsetzung betont werden, dass derzeit keines dieser Verfahren eine vollständig befriedigende Lösung darstellt. Bei den Versuchen, Knorpeldefekte im Sinne der tatsächlichen Knorpelheilung zu regenerieren, sind erste Erfolge zu verzeichnen, doch sind die Therapieoptionen dieser Methoden beschränkt. Obwohl schon erste Langzeitresultate vorhanden sind, genügen diese keinesfalls für eine abschließende, sichere Beurteilung ihrer langfristigen therapeutischen Qualität⁵⁷. Weiterhin sind die derzeit zur Verfügung stehenden

Methoden nur bei eng umschriebenen Defektsituationen Erfolg versprechend. Der ideale Patient für eine biologische Rekonstruktion sollte derzeit nicht älter als 50 Jahre sein, es sollte ein isolierter chondraler oder osteochondraler Defekt der femoralen Kondyle vorliegen und es sollten keine entzündlichen Prozesse oder pathologischen Beinachsenverhältnisse bestehen. Diese Therapievoraussetzungen schränken die Verwendung der biologisch rekonstruktiven Methoden erheblich ein⁶².

Für die biologische Rekonstruktion verletzter Gelenkoberflächen werden derzeit hauptsächlich die in der folgenden Tabelle zusammengefassten Verfahren klinisch angewandt:

	Tissue Response	OCT (z.B. Mosaikplastik, OATS)	ACT
Kinder und Jugendliche	+++	+	
Defekte bis 1 cm ²	+++	+	
Defekte von 1-3 cm ²	+	+++	+
Defekte von 3-14 cm ²		+	+++

Tabelle 1: Differentialindikationen verschiedener Techniken der biologischen Gelenk-Knorpel-Rekonstruktion⁶³.

1.6.1. Die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)

Bei der autologen Chondrozytentransplantation wird dem Patienten arthroskopisch ein Knorpelstückchen aus einem nicht-tragenden Gelenkanteil entnommen und unter Einhaltung strenger hygienischer Maßnahmen in ein

spezielles Zellkulturlabor transportiert. Dort werden die Knorpelzellen aus ihrem Gewebeverband und der extrazellulären Matrix enzymatisch herausgelöst. Die isolierten Zellen werden anschließend durch spezifische Zellkulturverfahren vermehrt. Nach drei bis vier Wochen ist eine ausreichende Zellzahl erreicht, und die Chondrozyten können anschließend in Suspension in einem offenen Gelenkeingriff unter einen zuvor auf den Defekt aufgenähten Periostlappen injiziert werden.

Die ersten klinischen Ergebnisse dieses Verfahrens wurden von Brittberg et al. 1994 veröffentlicht⁶⁴. Die meisten in Folge publizierten Resultate von Langzeituntersuchungen sind viel versprechend^{65 66}. Im Gegensatz zu den anderen Methoden mit biologisch rekonstruktiver Zielsetzung kann nach der Empfehlung der Deutschen Fachgesellschaften der Unfallchirurgen und Orthopäden⁶⁷ die ACT auch bei Defektgrößen größer als 4 cm² eingesetzt werden⁶⁸.

Trotz der viel versprechenden Ergebnisse wird die ACT in der von Brittberg publizierten Form kontrovers diskutiert. Dies hat mehrere Ursachen und ist neben den beträchtlichen Kosten für diese Methode vor allem auch in der ungeklärten Frage begründet, ob die transplantierten Zellen die eigentliche Defektreparatur bewirken oder der über die Defektkammer genähte Periostlappen. Darüber hinaus sind die in der Literatur veröffentlichten histologischen Regeneratergebnisse nach ACT äußerst divergierend. Von hyalinartigem Knorpel über Faserknorpel bis hin zu keinerlei Geweberegeneration wird in den unterschiedlichen Untersuchungen nach ACT berichtet⁶⁹. Ein Problem in der wissenschaftlichen Beurteilung der veröffentlichten Ergebnisse ist darin zu sehen, dass in der Regel von den Autoren verschiedene Zellkulturprotokolle verwendet wurden und keinerlei molekularbiologische Qualitätsprüfungen im Vorfeld der Transplantation der ex vivo angezüchteten Zellen durchgeführt worden sind⁷⁰.

Dass eine definierte Transplantatqualität jedoch auch für die ACT von zentraler Bedeutung sein könnte, lässt eine erst kürzlich publizierte Arbeit von Dell'Accio et al. vermuten⁷¹.

In der immundefizienten Nacktmaus konnte bei Verwendung humaner Chondrozyten, Periostzellen oder Fibroblasten gezeigt werden, dass ausschließlich hochdifferenzierte Chondrozyten stabilen, hyalinen Knorpel in vivo regenerieren können. Periostzellen, Fibroblasten oder auch durch mehrfache Populationsverdoppelungen in Monolayerkultur dedifferenzierte Chondrozyten waren nicht in der Lage ein qualitativ hochwertiges Knorpelregenerat in vivo zu bilden.

Die Fähigkeit der Chondrozyten zur Synthese von hyalinem Knorpel hing in diesen Untersuchungen auch von einem bestimmten Expressionsprofil für chondrozytenrelevante Markergene ab. Die Expression von Kollagen-Typ-II, FGFR-3 und die von BMP-2 korrelierte in vitro mit der Fähigkeit zur Bildung von hyalinem Knorpel in vivo. Ein Expressionsverlust dieser Faktoren und die damit einhergehende Induktion der Expression von ALK-1 in vitro führte zu einem irreversiblen Fähigkeitsverlust der Chondrozyten in vivo hyalinen Knorpel zu regenerieren.

Diese Untersuchungen zeigen deutlich, dass für eine qualitativ hochwertige Reparaturleistung der Knorpelzellen in vivo also nicht nur die Expression knorpeltypischer Matrixproteine von Bedeutung ist, sondern ebenso die Expression von bestimmten Wachstumsfaktoren und deren korrespondierenden Rezeptoren.

1.6.2. Dedifferenzierung artikulärer Chondrozyten durch Zellexpansion

Dass Knorpelzellen in Monolayerkultur in Abhängigkeit der Populationsverdoppelung, Passagenzahl und Kultivierungszeit dedifferenzieren, ist seit längerem bekannt⁷².

In einem geeigneten dreidimensionalen Zellkultursystem können dedifferenzierte Chondrozyten zwar wieder redifferenzieren⁷³, jedoch ist nach neueren Ergebnissen bei humanen artikulären Knorpelzellen ab einem bestimmten Expansionsstadium nur noch eine inkomplette Redifferenzierung in einem redifferenzierungsfördernden Kultursystem möglich⁷⁴. Dass das

Phänomen der inkompletten Redifferenzierung in Abhängigkeit der vorausgegangenen Expansionsbedingungen auch in vivo von großer Relevanz ist, zeigen die oben beschriebenen Untersuchungsergebnisse von Dell'Accio et al. In vitro expandierte artikuläre Knorpelzellen zur therapeutischen Anwendung sollten daher vor dem Eintreten irreversibler Dedifferenzierung transplantiert werden^{75 76}. Exzessive Populationsverdoppelungen, Subkultivierungen oder Einfriertechniken mit der anschließend notwendigen Zwischenkultivierung der Knorpelzellen vor Retransplantation sollten nicht vorgenommen werden. Manche Autoren empfehlen daher ausschließlich die Transplantation angezüchteter Knorpelzellen aus der Primärkultur, um die durch hochgradige Dedifferenzierung induzierten Stoffwechselveränderungen der Zellen zu vermeiden⁷⁷.

Grundsätzlich sind jedoch Expressionsanalysen knorpelrelevanter Markergene von zur Transplantation angezüchteten Knorpelzellen zur Beurteilung der Transplantatqualität und zur Beurteilung der Methodeneffizienz in der Weiterentwicklung bestehender Verfahren zur Transplantatherstellung unumgänglich.

1.7 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Markergene im Bereich der bekannten, mito- und morphogenen Wachstumsfaktoren zu identifizieren, deren Expression in artikulären humanen Chondrozyten durch unterschiedliche Kulturbedingungen möglicherweise induziert wird. Hierfür wurde die qualitative Genexpression von TGF β -1, -2, -3, BMP-2, GDF-5, CTGF mittels mRNA-Messung untersucht. Verglichen wurden artikuläre humane Knorpelzellen, expandiert in einem zweidimensionalen, dedifferenzierungsfördernden Kultursystem (Monolayer) mit Zellen des selben Spenders, rekultiviert in einem dreidimensionalen, differenzierungsfördernden Kultursystem (Alginate). Außerdem sollte festgestellt werden, ob unter den beschriebenen Bedingungen

nicht nur kultur- sondern auch spenderabhängige Unterschiede in der Expression der genannten Markergene auftreten.

Die qualitativen Expressionsanalysen wurden mittels Endpunkt RT/PCR durchgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, da es qualitativ zum einen ein schnelles und effizientes Screening von relevanten Markergenen erlaubt, und zum anderen zunehmend in der molekularbiologischen Qualitätskontrolle von Chondrozytentransplantaten verwendet wird. Quantitative Expressionsanalysen mittels „real time“- PCR wurden zur eingehenderen Untersuchung ausgewählter Wachstumsfaktoren (GDF-5 und BMP-2) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Humanes Biopsiematerial

Für die Versuche wurde hyalines Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk von zehn Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen entnommen. Der Verwendung eines Teils des Biopsiematerials zu diagnostischen Zwecken hatten die Patienten vorher schriftlich zugestimmt. Ein entsprechender Antrag bei der Ethikkommission war genehmigt worden.

Das Gewebe wurde von nicht-tragenden Stellen innerhalb des Gelenks entfernt. Aus dem entnommenen Knorpel wurde ein Aliquot angefertigt. Das zur autologen Knorpelzelltransplantation bestimmte Gewebe wurde getrennt und in eine Zellkultur gegeben. Das für die Experimente bestimmte Biopsiematerial wurde für seine Zellkultur nach folgender Methode vorbereitet.

2.1.2. Chemikalien, Reagenzien, Medien und Primer

Basenpaarmarker (100 bp DNA Ladder, 1 µg/µl; Fa. Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, BRD)

Ethidiumbromid (10 mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig, BRD)

Alginate Gel (Keltone LV, 1,2% in 150 mM NaCl, Kelco, ISP Alginates, San Diego, USA)

2.1.2.1. Chondrozytenisolation

- Kollagenase (1560 U/ml), Firma Sigma
- Dispase (24 U/ml) Firma Roche

2.1.2.2. Kulturmedium

- PBS: Phosphate Buffered Saline, Firma Gibco, 76131 Karlsruhe, BRD
- DMEM Nut Mix F12 (HAM), Firma Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Firma Gibco
- Nutrient Mixture F-12 (HAM), Firma Gibco

2.1.2.3. RNA- Extraktion

RNeasy Mini-Kit Qiagen:

- RLT-Puffer
- RPE-Puffer
- RW1-Puffer
- RNase-freies Wasser
- DNase-Vorratslösung
- RDD-Puffer
- 70% Ethanol

RLT-Puffer 10 ml RLT-Puffer mit 100 µl Mercaptoethanol versetzen.

DNase – Vorratslösung wurde mit 550 µl RNase –freiem Wasser gelöst. Dann wurden 20 µl aliquotiert und bei –20°C eingefroren.

2.1.2.4. Umschreibung in cDNA

Advantage RT-for-PCR Kit, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA

Bestehend aus:

- Oligo (dT)₁₈ primer (20 µM)
- 5X Reaktions-Puffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8,3
375 mM KCl
15 mM MgCl₂
- Rekombinanter Rnase Inhibitor, 40 units/µl
- dNTP mix (jeweils 10 mM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MMLV Reverse Transkriptase, 200 units/µl
- DEPC behandeltes Wasser (Diethyl-pyrocbonat, 1:1000)

2.1.2.5. RT-PCR

2.1.2.5.1. Master Mix

- 10X PCR Reaktions-Puffer, pH 8,3/15 mM MgCl₂ von Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
- dNTP mix (jeweils 25 mM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) von Amersham Pharmacia Biotech, Inc., New Jersey, USA
- AmpliTaq® DNA Polymerase von Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA

2.1.2.5.2. Primer

Tabelle 2. Primer und die erwartete Größe der PCR-Produkte jedes Primer-Paares

<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz</i>	<i>Annealing Temperatur (in °C)</i>	<i>Quelle</i>	<i>Basenpaar Länge</i>
GDF 5	upstream 5' GCCCTGTTCTGGTGTGG 3' downstream 5' GCTGTGTAGATGCTCCTGCC 3'	60	F. Luyten	595
CTGF	upstream 5' ACGAGCCCAAGGACCAAA 3' downstream 5' TTGTAATGGCAGGCACAG 3'	60	E.H. Lee et al.	483
bFGF	upstream 5' GAGAAGAGCGACCCTCACA 3' downstream 5' TAGCTTTCTGCCAGGTCC 3'	55	R&D Systems	277
IGF I	upstream 5' ACATCTCCCATCTCTGGATTTCTTTTGC 3' downstream 5' CCCTCTACTTGCGTTCTTCAAATGTACTION 3'	60	Clontech	514
IGF II	upstream 5' AGTCGATGCTGGTCTTCTCACCTTCTTGGC 3' downstream 5' TGCGGCAGTTTTGCTCACTTCCGATTGCTGG 3'	60	Clontech	538
TGFb 1	upstream 5' GCCCTGGACACCAACTATTGCT 3' downstream 5' AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG 3'	60	Clontech	161
TGFb 2	upstream 5' GATTTCCATCTACAAGACCACGAGGGACTTGC 3' downstream 5' CAGCATCAGTTACATCGAAGGAGAGCCATTTCG 3'	60	Clontech	503
TGFb 3	upstream 5' ATGACCCACGTCCCCTATCAGG 3' downstream 5' GGTTCATTTTTCTCCACTGAG 3'	61	Ambion	249
BMP 2	upstream 5' GCTGTACTAGCGACACCCAC 3' downstream 5' TCATAAACCTGCAACAGCCAACTCG 3'	60	A. Ogose et al.	671

BMP 4	upstream 5' GCTGAAGTCCACATAGAGCGAGTG 3'	60	A. Ogose	346
	downstream 5' ACTGGTCCACCACAATGTGACACG 3'		et al.	
MMP 3	upstream 5' GAGTCAGGTCTGTGAGTGAGTG 3'	60	N. Ishiguro	506
	downstream 5' ACTCCGACACTCTGGAGGTGAT 3'		et al.	
β Actin	upstream 5' ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC 3'	55	Clontech	516
	downstream 5' TGTCACCTTCACCGTTCCAG 3'			
Coll I	upstream 5' AGCGCTGGTTTCGACTTCAGCTTCC 3'	64	Clontech	466
	downstream 5' CATCGGCAGGGTCGGAGCCCT 3'			
Coll II	upstream 5' CTGGCTCCCAACTGCCAACGTC 3'	64	Clontech	414
	downstream 5' TCCTTTGGGTTTGCAACGGAATTGT 3'			

2.1.2.6. Quantitative PCR mit LightCycler (Fa. Roche)

Mastermixe für quantitative PCR mit LightCycler (Roche):

Mischstandard für GAPDH, Kollagen Typ II, Kollagen Typ I, BMP-2 (LightCycler TM Primer Set, Search LC)

Angabe für 2 Proben inklusive Negativkontrolle:

- 12 µl H₂O
- 4 µl LightCycler TM Primerset
- 4 µl LightCycler TM FastStart DNA Master SybrGreenI, premixed (Roche), gemäß Angabe Roche 20 µl ->10 µl je Tube

Patienten-Mixe (LightCycler TM Primer Set, Search LC)

Angabe für Neg-Kontrolle und Patient Probe 1 und 2:

42 µl H₂O

6 µl LightCycler TM Primer Set

6 µl LightCycler TM FastStart DNA Master SybrGreenI premixed (Roche)

54 µl ->18 µl je Tube

2.1.2.7. Immunfluoreszenzfärbung

- Fixierung in 4% Formalin und OCT Tissue-Tek Compund (Firma Sakura).
- Schnitte von µm Dicke wurden mit Kryotom „Jung Frigocut 2800E cryostat“ angefertigt.
- Anschliessend wurden die Schnitte auf „Superfrost plus glass microscope slides fixiert (Firma Erie Scientific Company).

2.1.2.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Absaugpumpe (Suc-O-Mat; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)

Brutschrank (CO2 Auto Zero; Fa. Heraeus, Hanau, BRD)

Einmalskalpelle (Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen, BRD)

Eppendorf-cups (0,5 ml, 1,8 ml; Eppendorf, Hamburg, BRD)

Feinwaage (Sartorius handy H51; Fa. Sartorius, Göttingen, BRD)

Gefrierschränke (Fa. Bosch, Stuttgart, BRD)

Gelkammer (Fa. Appligene, Heidelberg, BRD)

Insulinspritzen (1 ml; Fa. Braun Medical AG, BRD)

Kanülen (Sterican 0,9×70 mm; Braun Medical AG, BRD)

Kühlschränke (Fa. Bosch)

Kulturflaschen (50 ml/250 ml; Fa. Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)

LightCycler (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Latexhandschuhe (Beiersdorf, Hamburg, BRD)

Lichtmikroskop (Fluovort FS Mikroskop; Fa. Leitz, BRD)

Mikrowellenofen (Fa. Bosch)

PCR-Block (Typ UNO II; Fa. Biometra, Göttingen, BRD)

Petrischalen (Cellstar, 94/16 mm, steril; Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)
Pinzetten (Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD)
Pipetten mit Sterilfilter (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, BRD)
Pipettierhilfen (Modell PreCision; Fa. Biozym; Modell Pipetman Fa. Gilson, Midleton, USA)
Schüttler (Ika MTS4; Fa. Bachofer)
Software (AnalySIS; Fa. Soft-Imaging Software, Münster, BRD)
Sterilbank (Gelaire Laminar Air Flow; Fa. BDK, Sonnenbühl, BRD)
Sterilffilter (Millex GV 0,22 µm; Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich)
Vario-Orthomat zur Bilddokumentation (Fa. Leitz)
Wärmeplatte mit Magnetrührer (Ikamag RCT; Janke&K., Staufen, BRD)
Wasserbad (DT Hetotherm; Fa. Bachofer)
Zentrifugen (Avanti 30/GPR; Fa. Beckmann, München, BRD)
Soft Imaging Systems analySIS, cf8 Kappa, Zeiss Objektiv
Desweiteren wurde herkömmliche Büroausstattung wie Personalcomputer und Drucker verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Chondrozytenisolation

An einem sterilen Arbeitsplatz wurde das Knorpelmaterial in einem 50 ml Cup (Firma Greiner) zweimal mit calciumhaltigen PBS (Firma Gibco) gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt.

Der Knorpel wurde mit einem sterilen Skalpell in eine sterile Petrischale überführt. Mineralisierter Knorpel und Knochenreste wurden abgetrennt. Die restlichen Knorpelstücke wurden erneut zweimal im 50 ml-Cup mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Knorpelgewebe mit zwei sterilen Skalpellern zerkleinert bis es eine musartige Konsistenz erreicht hatte. Für diesen Vorgang

wurden zwei bis drei Tropfen PBS hinzu gegeben um eine Austrocknung zu verhindern. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit einem sterilen Skalpell in eine kleine Zellkulturflasche (Firma Falcon) überführt.

Anschließend wurde der Vorverdau durchgeführt. Hierzu wurden dem Knorpel 10 ml Collagenase (1560 U/ml; Fa. Sigma) und 5 ml Dispase (24 U/ml; Fa. Roche) als Mix beigefügt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 37°C und 5,0 Vol.% CO₂ in einem Brutschrank (Fa. WTC Binder) inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Der vorverdaute Knorpel wurde mit 10 ml PBS gewaschen und mit einer Pipette mehrmals resuspendiert. Um den Knorpel setzen zu lassen wurde die Zellkulturflasche abgeklopft und dann schräg auf einen Ständer gestellt. Der Überstand wurde abgesaugt.

Der angedaute Knorpel wurde anschließend mit 10 ml Collagenase (1560 U/ml) versetzt und bei 37°C und 5,0 Vol.% CO₂ 6-10h inkubiert. Bei diesem Vorgang wurde die Matrix aufgelöst, was durch mikroskopische Kontrolle verifiziert wurde. Anschließend wurde dem Gemisch 10 ml Dispase (24 U/ml) beigefügt und bei 37°C und 5,0 Vol.% CO₂ 10-20 min inkubiert. Die Chondrozyten wurden, um sie zu vereinzeln, mit einer Pipette resuspendiert und dann in ein 50 ml-Cup überführt. Weiterhin wurden die Zellen zweimal mit serumfreien Medium gewaschen, um sie daraufhin in eine mittlere Zellkulturflasche mit 10 ml Vollmedium zu überführen. Diese Zellkultur wurde bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5,0 Vol.% CO₂ inkubiert.

Waren die Zellen nach zwei Tagen unter mikroskopischer Kontrolle nicht vereinzelt und/oder adhärent gewachsen, wurde ein Nachverdau mit 10 ml Collagenase (1560 U/ml) und 5 ml Dispase (24 U/ml) als Mix durchgeführt; das Gemisch wurde wiederum bei 37°C und 5,0 Vol.% CO₂ 10 min. inkubiert.

2.2.1.2. Kultivieren von Chondrozyten

Die isolierten Chondrozyten wurden in einem optimierten Zellkulturmedium angezchtet. Das Vollmedium setzte sich aus 45% Ham's F12 (Fa. Gibco), 45% DMEM (Fa. Gibco) und 10% autologem Patientenserum zusammen. Diesem

Medium wurde Ascorbat in einer Konzentration von 25 µg pro ml beigefügt. Die suspendierten Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5,0 Vol.% CO₂ kultiviert. Auf eine Beigabe von Antibiotika wurde unter Einhaltung strengster hygienischer Maßnahmen verzichtet um eine mögliche Interferenz mit dem Kultivierungsverhalten der Chondrozyten zu vermeiden.

Für die zweidimensionale Kultur wurden die Chondrozyten 10 Tage vorkultiviert und nach Passagierung 10 Tage weiterkultiviert.

Die dreidimensionale Kultivierung in Alginatbeads wurde nach vorheriger Vorkultivierung für 10 Tage in zweidimensionaler Kultur, für weitere 10 Tage in Alginatbeads fortgeführt.

Im Anschluss wurden jeweils die Expressionsanalysen vollzogen.

2.2.1.3. Zweidimensionale Zellkultur

Zur Kultivierung in einem zweidimensionalen Zellkultursystem wurden die Chondrozyten in einer 250 ml Zellkulturflasche mit oben beschriebenem Vollmedium gegeben. Die Ausbringung in dieses System ermöglicht den Zellen eine Adhärenz am Flaschenboden, wobei sich im Kultivierungsverlauf ein Zellrasen ausbildet.

2.2.1.4. Kultivieren von Chondrozyten in Alginatbeads

2.2.1.4.1. Herstellung einer Alginatlösung

Zur Herstellung einer 1,2%igen Alginatlösung wurden sterilfiltriertes 0,9%iges NaCl über Nacht unter Rühren aufgelöst. Die Lösung wurde dann mit einem großen Sterilfilter filtriert.

2.2.1.4.2. Ansetzen einer Alginatkultur

Nachdem die Chondrozyten mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie mit der Alginatlösung versetzt. Hierbei wurden in die Alginatlösung ungefähr 4 Mio. Zellen gegeben. Diese Zellsuspension wurde in einer sterilen 10 ml-Spritze mit einer 22er Kanüle einpipettiert. Die Suspension wurde daraufhin zügig in 100 ml CaCl₂ (102 mM) unter Rühren eingetropt. Die entstandenen Beads wurden bei niedriger Umdrehung 10 min. geliert und dann in eine mittlere Zellkulturflasche (Firma Falcon) überführt. Die Beads wurden einmal mit PBS (Firma Gibco) und 0,9% NaCl gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt. Hierbei war es wichtig zügig zu arbeiten, da die entstandenen Beads sich schnell wieder auflösen können. Die Beads wurden mit 20 ml DMEM Nut Mix F12 (HAM) (Firma Gibco), 10% autologes Patientenserum und 25 µg/ml Ascorbinsäure versorgt. Die Zellkultur wurde dann in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert.

2.2.1.4.3. Auflösen der Beads

Um eine RNA Extraktion aus den kultivierten Zellen zu ermöglichen, mussten sie aus der dreidimensionalen Alginatmatrix herausgelöst werden.

Die Beads wurden in 4 Volumen isotoner Na-Citrat-Lösung (55 mM NaCitrat/ 90 mM NaCl) für 10-15 min. aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit zellassoziierter Matrix in ein 50 ml-Cup (Firma Greiner) überführt und bei 1000 U/min 10 min. zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen.

2.2.2. RNA Isolation

2.2.2.1. Zellyse

Alle folgenden Schritte mussten zügig bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Vor der eigentlichen Lyse wurden die Zellen einmal mit nicht calciumhaltigen PBS gewaschen. Hierzu wurden sie in ein Eppendorf-Cup aufgenommen und 1 ml PBS hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 2000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und den verbleibenden Zellen 50 µl PBS beigemischt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Mikrozentrifuge (Eppendorf) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden unter Verwendung einer Insulinspritze mit 25er Kanüle homogenisiert.

Den Herstellerangaben folgend, wurden die Zellen, abhängig von der Zellzahl, in verschiedene Volumina aufgenommen. Bis zu einer Zellzahl von 5×10^6 das kleinere Volumen, ab einer von 5×10^6 bis 1×10^7 das größere.

Es wurden 350 µl/600 µl RLT-Puffer zugegeben und wiederum mit der Kanüle homogenisiert, bis keine Zellklümpchen mehr sichtbar waren.

Dann wurde die Zellsuspension in 350 µl/600 µl 70%iges Ethanol mit einer Pipette suspendiert. Das gesamte Volumen wurde auf eine Säule (Spin Column) aus dem Kit des Herstellers aufgetragen. Die Säule wurde in eine 2 ml-Tube aus dem Kit gesetzt, um das Eluat aufzufangen. Überstieg hierbei das Gesamtvolumen 700 µl, so wurde die Suspension in eine zweite Säule aliquotiert. Die Säulen wurden dann 15 sec. Bei einer Drehzahl von 10.000 U/min zentrifugiert.

2.2.2.2. Waschen

Nach dem Zentrifugieren wurden 700 µl RW1-Puffer in die Säulen hinzugegeben. Es wurde nochmals 15 sec. bei 10.000 U/min. zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde dann in eine neue 2 ml-Tube gesetzt und 500 µl RPE-Puffer wurden zugegeben. Erneut wurde 15 sec. bei 10.000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Wiederum wurden 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, nun aber 2 min. bei 20.000 U/min. zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde anschließend 15 sec. bei

20.000 U/min zentrifugiert. Es durfte kein Tropfen Ethanol mehr an der Säule sein.

2.2.2.3. Eluierung der RNA

Die Säule wurde in ein Eppendorf-Cup gestellt und die RNA mit 30 µl RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert. Hierzu wurde die Säule im Eppendorf-Cup 1 min. bei 10.000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA bis zur Umschreibung bei -70°C eingefroren.

2.2.2.4. OD-Vermessung der RNA mit GeneQuant (Pharmacia)

Zur OD-Vermessung wurden RNA-Lösung mit DEPC-Wasser in einem Verhältnis von 1:20 gemischt.

Vier µl RNA wurden 76 µl DEPC-Wasser (Roth) in Eppendorf-Cup zugesetzt und gemischt. Vor der Messung Nullabgleich des Photometers. Die verdünnte Lösung wurde in eine 70 µl Quarzküvette pipettiert. Dann Vermessung der RNA-Probenverdünnung im RNA-Programm. Angabe der Konzentration in µg/ml.

Ein µg RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt, der Rest bis zum Abschluss der Tests bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist der erste Schritt einer aus reverser Transkription und anschließender Amplifikation der gewonnenen cDNA bestehenden Methode. Diese RT-PCR stellt eine Weiterentwicklung und Verknüpfung von schon verwendeten Techniken dar.⁷⁸ Die isolierte mRNA wird durch das Enzym reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Eine Denaturierung

doppelsträngiger DNA Sequenzen durch Erhitzen ermöglicht eine Anbindung von Oligonukleotiden. Die Verknüpfung der Oligonukleotide mit den denaturierten DNA-Einzelsträngen wird durch eine spezifische DNA Polymerase bewerkstelligt. Dieses „annealing“ wird durch die besondere Eigenschaft der Taq-Polymerase ermöglicht. Sie ist in der Lage bei hohen Temperaturen zu funktionieren und ermöglicht dadurch das Anknüpfen von Oligonukleotiden bei 94°C an die bei diesen Temperaturen denaturierten DNA Einzelstränge. Die Verwendung spezifischer Primer macht das ausschließliche Vermehren erwünschter Sequenzen möglich. Durch diese exponentielle Amplifikation können geringste Mengen von Genmaterial selektiv vermehrt werden. Mittels Gelelektrophorese können die amplifizierten PCR Produkte sichtbar gemacht werden.

Zur Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde der Advantage RT-for-PCR Kit der Firma Clontech verwendet.

Nachdem die Reagenzien und die RNA auf Eis aufgetaut worden waren, wurden je 2 µg RNA, nach Auflösung in maximal 25 µl DEPC behandeltem Wasser, mit je 2 µl eines 20 µM Oligo (dT)₁₈ Primers versehen. Das Gemisch wurde in ein kleines Eppendorf-Cup (0,5 ml) gegeben. Anschließend wurde es für 2 min. bei 70°C in einem PCR-Block erhitzt. Danach wurde es sofort für 5 min. auf Eis gelegt. Das sofortige Abkühlen ermöglicht ein suffizientes Anbinden des Primers und verhindert eine Rückfaltung der entfalteten RNA-Sequenzen. Als Mastermix für die Umschreibung wurden pro Probe 8 µl 5x Reaktions-Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl Rekombinanter Rnase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu je 10 mM) und 2 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) gemischt. Zu diesem Mastermix wurde das Gemisch aus RNA und Oligo (dT)₁₈ Primer hinzugefügt. Die reverse Transkription wurde dann in einem PCR-Block bei 42°C mit einer Dauer von einer Stunde vollzogen. Unmittelbar anschließend wurde das Gemisch für fünf Minuten auf 94°C erhitzt, um die reverse Transkription und die hierdurch erfolgende Synthese der cDNA zu beenden.

Nach der Umschreibung wurde jede Probe mit 160 µl DEPC-Wasser versetzt und dann bei -20°C gelagert.

2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde zuerst ein Mastermix hergestellt. Pro Probe wurden hierzu 5 µl 10x Reaktions-Puffer (Perkin Elmer), 0,5 µl 100 mM dNTP-Mix (Amersham Pharmacia), 1 µl Upstream Primer, 1 µl Downstream Primer (jeweils 0,1 nmol/µl), 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; Perkin Elmer) und 37 µl aqua bidest. gemischt. Zu diesem Mastermix wurde jeweils 5 µl cDNA-Lösung hinzugegeben und in einem PCR-Block (Firma Biometra) zur Reaktion gebracht.

Ein Amplifikationszyklus bestand aus einer einminütigen Denaturierung bei 94°C und einer anschließenden „annealing“ Phase, deren Temperatur dem jeweiligen Primer für das untersuchte Gen angepasst wurde. Auf diesen Schritt folgte die Extensionsphase bei 72°C für zwei Minuten. Daraufhin wurde der Zyklus von Neuem begonnen. Die Anzahl der Amplifikationszyklen für eine PCR betrug 33, nachdem in Vorversuchen sichergestellt worden war, dass sich die Amplifikation der Genprodukte bei dieser Anzahl von Wiederholungen in der exponentiellen Phase befand.

2.2.5. Quantitative Expressionsanalyse mit LightCycler™ (Roche)

Die Pipettierschritte der PCR wurden in einem separaten Raum durchgeführt. Eingabe des Mischstandards für GAPDH, Kollagen Typ II, Kollagen Typ I, BMP-2, GDF 5, der Patienten-Probe sowie der Negativkontrollen in die Sample Liste des LightCyclers.

Durchführen des ersten Laufes, mit anschließendem Speichern des Laufes, des Datums und Drucken einer Sample Liste.

Die notwendigen Mastermixes wurden wie folgt vorbereitet.

Mischstandard für GAPDH, Kollagen Typ II, Kollagen Typ I, BMP-2, GDF 5 (LightCycler TM Primer Set, Search LC).

Angabe für 2 Proben inklusive Negativkontrolle:

- 12 µl H₂O
- 4 µl LightCycler TM Primerset
- 4 µl LightCycler TM FastStart DNA Master SybrGreen I , premixed (Roche), gemäß Angabe Roche

20 µl ->10 µl je Tube

Patienten-Mixe (LightCycler TM Primer Set, Search LC)

Angabe für Neg-Kontrolle und Patient Probe 1 und 2:

- 42 µl H₂O
- 6 µl LightCycler TM Primer Set
- 6 µl LightCycler TM FastStart DNA Master SybrGreen I premixed (Roche), gemäß Angabe Fa. Roche

54 µl ->18 µl je Tube

Die LightCycler – Kapillare wurde in den Zentrifugenadapter im Kühlblock gestellt. Dann wurden die Mastermixe nach der Sample-Liste in die nummerierten Kapillaren pipettiert. Anschließendes Pipettieren der cDNA nach Sample-Liste und Verschluss der Kapillare mit Stoppfern. Die Kapillaren wurden in den Zentrifugenadaptern bei 1000 U/min anzentrifugiert. Dann wurden die Kapillaren in das Proben-Karussell gestellt und der LightCycler gestartet. Der jeweilige Lauf wurde unter der Patienten-Identifikations-Nummer und dem Datum gespeichert.

2.2.6. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 1,5% Agarose (Firma BioRad) verwendet. Es wurden 6 g Agarose auf 400 ml 1xTBE Puffer gegeben und 30 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Firma Amersham) hinzugefügt. Zur Herstellung des 1xTBE Puffer wurden auf 20 ml 20xTBE Puffer, bestehend aus 121 g Trisaminomethan, 61,7 g Borsäure und 7,44 g EDTA-Natrium auf einen Liter destillierten Wasser, 380 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. Als Größenmarker wurde ein 100 bp-Marker-Mix (Firma BRL Life Technologies) verwendet.

Das Gemisch wurde in einem herkömmlichen Mikrowellengerät aufgeköcht bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Danach wurde es an der Luft auf 60°C abgekühlt und 75 ml des flüssigen Gels wurden in eine Gelkammer gebracht. Die Gelkammer wurde mit einem Kamm bestückt, der Einprägungen im erkaltenden Gel hinterläßt, die als Taschen zum Beladen mit PCR-Produkten dienen. Sobald das Gel in der Kammer erkaltet war, wurde eine ausreichende Menge an 1xTBE als Laufpuffer hinzugegeben, um das Gel vollständig zu bedecken.

Es wurden dann 15 µl PCR-Produkt mit 5 µl DNA-Ladepuffer vermischt und in die vorgeprägten Taschen im Agarosegel pipettiert. Zehn µl 100 bp-Marker-Mix wurden ebenfalls in eine vorgeprägte Tasche pipettiert. Der Mix wurde aus 30 µl 100 bp-Ladder, 80 µl DNA-Ladepuffer und 50 µl aqua bidest. gemischt.

Eine Menge von 10 ml DNA-Ladepuffer setzt sich aus 250 µl 40xTAE-Puffer, 1 ml Xylene Zyanol, 1 ml Bromophenolblau, 5 ml Glycerin und 2,75 ml destillierten Wasser zusammen. Der 40xTBE-Puffer besteht aus 193,6 g Trisaminomethan, 108,9 g Natriumacetat und 15,2 g EDTA-Natrium auf einen Liter destilliertes Wasser.

Nach vollständiger Bestückung des Gels wurde zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte ein Stromfluß von 5 Milliampere bei einer Spannung von 70 Volt erzeugt. Durch visuelle Kontrolle der Lauffront wurde nach ausreichender Laufzeit (45-60 min.) die Elektrophorese gestoppt. Die Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid ermöglichte eine Visualisierung der

PCR-Produkte durch ultraviolettes Licht. Das bestrahlte Gel wurde sodann mittels einer Videokamera mit vorgeschaltetem Gelbfilter auf einem Computer digitalisiert und archiviert. Die Bearbeitung der Bilder wurde mittels der Software AnalySIS vollzogen.

Die Signale der amplifizierten Sequenzen wurden zum 100 bp Marker in Beziehung gesetzt und die Positionen anhand der bekannten Produktgrößen der Primer verifiziert.

2.2.7. Immunfluoreszenzfärbung

Die zu färbenden Alginatbeads wurden auf einer festen Unterlage angehäuft und auf flüssigem Stickstoff mit Tissue Tec gefroren. Mit dem Kryotom wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 16 µm geschnitten. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur mindestens zwei Stunden an der Luft getrocknet.

Die getrockneten Schnitte wurden zum Fixieren zuerst mit PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung mit 4% Formalin/PBS- fand über eine Dauer von 20 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur statt. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen.

Zur Detektion wurden die fixierten Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur mit DMEM/F12 mit 10% Humanserum geblockt. Anschließend fand eine Inkubation der Schnitte mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur statt. Nach dreißig Minuten wurde zweimal mit PBS gewaschen. Mit dem zweiten Antikörper (IgG und IgM), der mit Cy3-konjugiert vorlag, wurde ebenfalls für eine Dauer von dreißig Minuten inkubiert. Eine Kernfärbung wurde anschließend für fünf Minuten vollzogen, wobei ein Tropfen des Färbemittels auf ein Volumen von 1.0 ml verdünnt wurde. Die Gefrierschnitte wurden nochmals mit PBS gewaschen, und anschließend in Mowiol eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 4°C. Es wurden parallel Negativkontrollen angefertigt, wobei nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Spenderabhängiges Expressionsverhalten

Die quantitative Expressionsanalyse von frisch isolierten, nicht in Zellkultur ausgebrachten, Chondrozyten zeigte signifikante patientenabhängige Unterschiede der Expression der Matrixproteine Kollagen-Typ- I und –II (Abb.1).

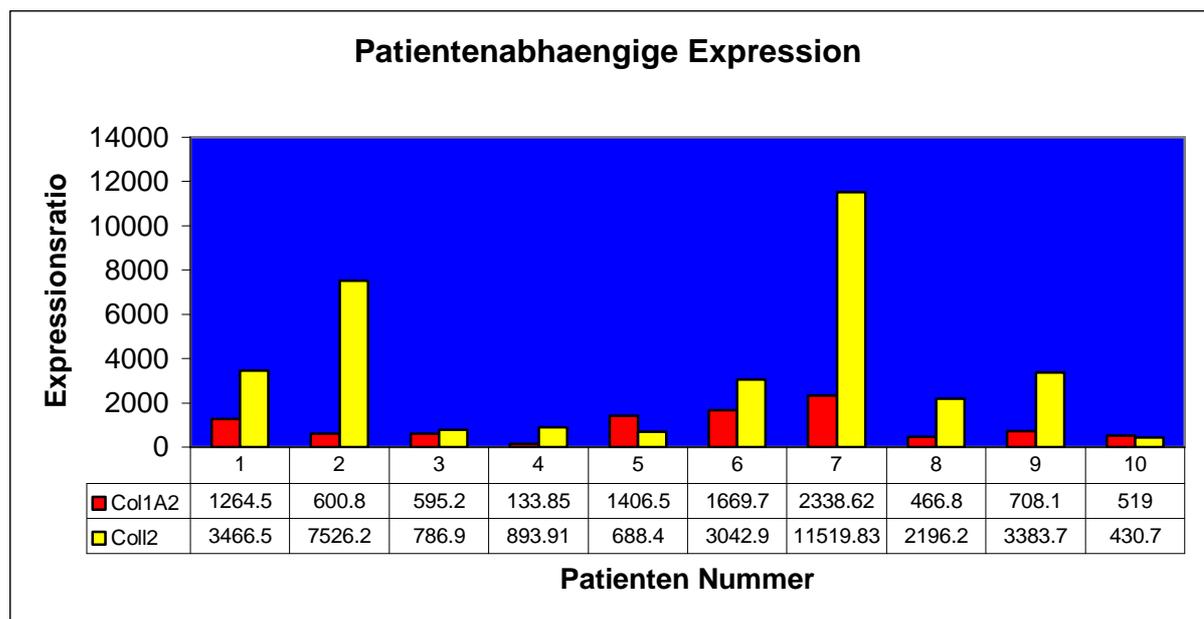


Abb.1: Patientenabhängige, quantitative Expressionsanalyse

3.2. Mikroskopische Kulturanalyse

3.2.1. Frisch isolierte Chondrozyten

Frisch isolierte Chondrozyten wurden in Zellkultur ausgebracht. Die Chondrozyten waren initial von extrazellulärer Matrix umgeben und zeigten die typische Morphologie von artikulären Chondrozyten (Abb.2 und Abb.3).

Die Zellen wurden im weiteren Verlauf in Monolayer und Alginat kultiviert. Um phänomenologische Unterschiede zu untersuchen, wurden mikroskopische

Analysen der Kulturverfahren angefertigt. Die morphologischen Veränderungen konnten zu den angefertigten biochemischen Analysen des Differenzierungsstatus der Chondrozyten bei den Kulturverfahren in Beziehung gesetzt werden.

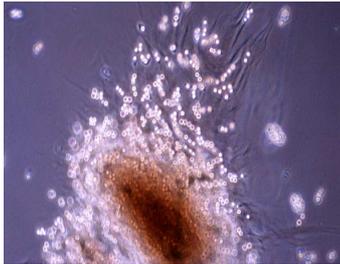


Abb.2: Angedaute Chondrozyten bei 10x Vergrößerung.

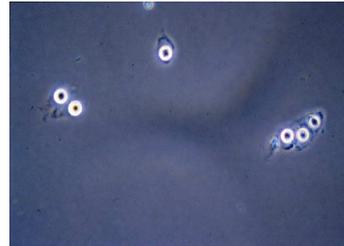


Abb.3: Angedaute, vereinzelte Chondrozyten in Primärkultur bei 20x Vergrößerung.

3.2.2. Kultivierung der Monolayerkultur

Nach zehn Tagen in Monolayerkultur zeigte sich in der Primärkultur ein dichter Zellrasen. Die Zellen wiesen überwiegend eine runde, polygonale Erscheinungsgestalt auf (Abb.4). Nach weiteren zehn Tagen in Monolayerkultur zeigte sich eine Veränderung der Zellmorphologie zu spindelförmigen und Fibroblasten ähnlichen Zellen (Abb.5).

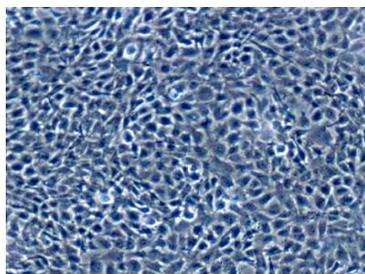


Abb.4: Chondrozyten der Primärkultur nach 10 Tagen in Monolayerkultur bei 10x Vergrößerung.

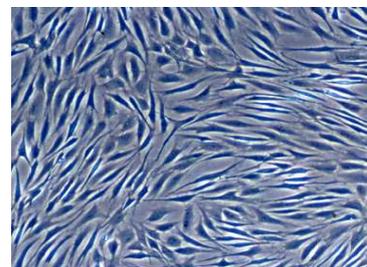


Abb.5: Chondrozyten in 1.Subkultur nach 20 Tagen Kultivierung in Monolayer bei 10x Vergrößerung.

3.2.3. Kultivierung in Alginat

Nach vorheriger Kultivierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur wurden sie für zehn Tage in Alginatkultur gebracht. In diesem System zeigten sie weiterhin die typische rundliche Morphologie artikulärer Chondrozyten (Abb.6). Die perizelluläre Matrix differenzierter artikulärer Chondrozyten ist reich an Proteoglykanen. Die für Proteoglykane spezifische Alcian-Blau-Färbung von in Alginat kultivierten Chondrozyten war positiv und gab damit einen weiteren Hinweis auf den Differenzierungszustand der untersuchten Zellen (Abb.7).

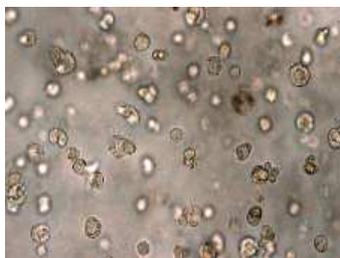


Abb.6: Chondrozyten nach 10 Tagen in Alginatkultur bei 10x Vergrößerung.

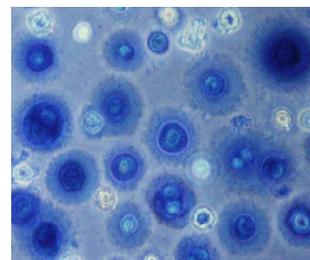


Abb. 7: Chondrozyten nach 10 Tagen In Alginatkultur bei 20x Vergrößerung. Alcian-Blaufärbung.

3.3. Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung

Als Marker für differenzierte Chondrozyten wurde eine Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung von in Primärkultur, Monolayer und Alginat kultivierten Zellen vorgenommen. Hiermit wurde das perizelluläre Vorkommen von Kollagen-Typ-II untersucht.

3.3.1. Primärkultur

Nach zehn Tagen in Primärkultur wurde eine Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Anfärbung in der perizellulären Matrix. Einhergehend mit dem vorherigen

mikroskopischen Befund deutet dies auf einen weitgehend stabilen chondrogenen Phänotyp hin (Abb.8).

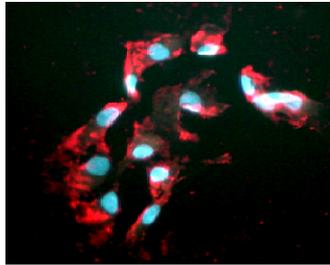


Abb. 8: Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung von präkonfluenten Chondrozyten in Primärkultur bei 40x Vergrößerung.

3.3.2. Monolayerkultur

Nach Passage der Primärkultur wurden die Chondrozyten für weitere zehn Tage in der ersten Subkultur bebrütet. Anschließend wurde ebenfalls eine für Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Es zeigte sich bei Präkonfluenz der Zellen eine nur vereinzelte perizelluläre Anfärbung. Der für differenzierte artikuläre Chondrozyten typische Nachweis von Kollagen-Typ-II gelang allenfalls noch in Spuren (Abb.9).

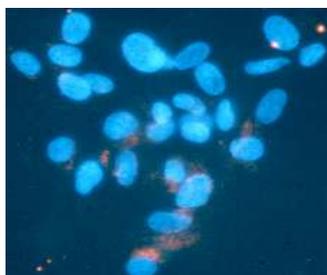


Abb.9: Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung von präkonfluenten Chondrozyten in der ersten Subkultur (Monolayer) bei 40x Vergrößerung.

3.3.3. Alginatkultur

Parallel zu der Kultivierung der Zellen in Monolayerkultur wurden weitere Zellen ebenfalls für zehn Tage in Alginat kultiviert. Auch diese Chondrozyten wurden immunhistologisch und mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich eine ausgeprägte perizelluläre Anfärbbarkeit für Kollagen-Typ-II. Die Zellen glichen somit phänotypisch den differenzierten Chondrozyten (Abb.10).

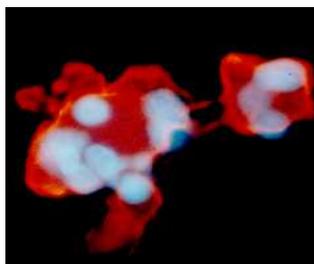


Abb.10: Kollagen-Typ-II spezifische Immunfluoreszenzfärbung von Chondrozyten in Alginatkultur bei 40x Vergrößerung.

3.4. Semiquantitative Analyse der Transkription des kartilaginären Matrixprotein Kollagen-Typ-II in Abhängigkeit von verschiedenen Zellkulturpassagen

Artikuläre Chondrozyten wurden im Monolayerverfahren expandiert und nach jeweils zehn Tagen in einem neuen Medium subkultiviert. Fünf Zellpassagen wurden vorgenommen. Die Zellen zeigten ein reges Wachstumsverhalten und wurden bei den Passagen jeweils aufgeteilt und in neue Kulturflaschen ausgesät.

Nach jeder Passage wurde ein Anteil der Zellen auf Transkription von Kollagen-Typ-II (COL2A1) mittels des semiquantitativen RT-PCR Verfahrens untersucht. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die semiquantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Mit zunehmender Passagenzahl konnte eine Abnahme der mRNA Expression für Kollagen-Typ-II beobachtet werden. Die deutlichste Abnahme fand sich von der zweiten zur dritten Subkultur (Abb.11).

Mit zunehmender Kultivierungsdauer im Monolayer konnte somit eine zunehmende Dedifferenzierung der Chondrozyten mit einer abnehmenden Transkription des Differenzierungsmarkers Kollagen-Typ-II festgestellt werden.

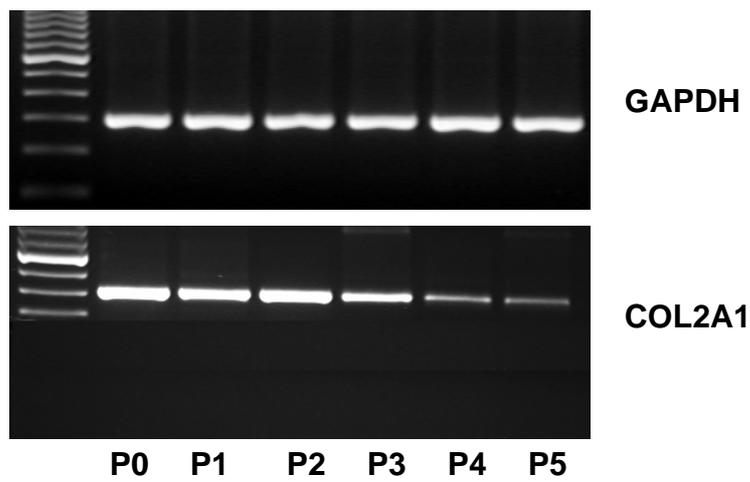


Abb.11: Expression in Abhängigkeit verschiedener Zellkulturpassagen

3.5. Quantitative Analyse der Transkription des kartilaginären Matrixprotein Kollagen-Typ-II in Abhängigkeit von zunehmender Subkultivierung

Zur genaueren Analyse der Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR wurde eine quantitative Analyse der Transkription von Kollagen-Typ-II angeschlossen. Dies wiederum in Abhängigkeit von zunehmenden Passageanzahlen der in Monolayer kultivierten Chondrozyten. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die quantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Analysen der Kollagen-Typ-II Transkription konnten mit der quantitativen Expressionsanalyse bestätigt werden (Abb.12).

Die höchste Kollagen-Typ-II Expression wurde in der Primärkultur nachgewiesen mit deutlicher Abnahme bis zur vierten Subkultur. Von der vierten zur fünften Subkultur stellte sich dann eine Stabilisierung der Expression auf sehr niedrigem Niveau ein. Zunehmende Subkultivierung zeigte somit eine fortschreitende Dedifferenzierung der Zellen im Sinne einer Abnahme des Differenzierungsmarkers Kollagen-Typ-II.

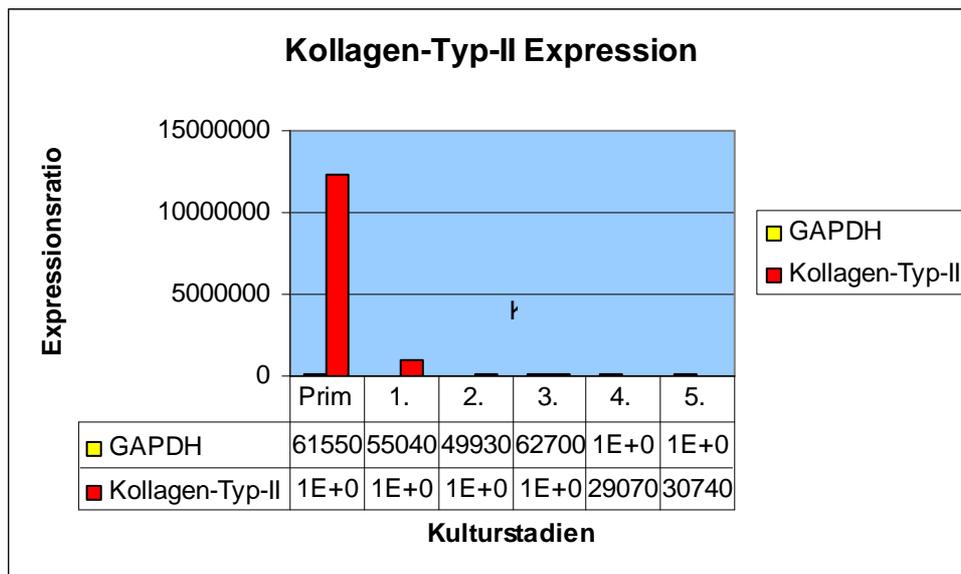


Abb.12: Semiquantitative Expressionsanalyse in Abhängigkeit verschiedener Zellkulturpassagen

3.6. Semiquantitative Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

Bei der semiquantitativen Analyse der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurde mRNA von Zellen aus Monolayer- und Alginatkultur gewonnen. Die Analyse wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die semiquantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Die folgenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurden analysiert: TGF- β -1-3, BMP-2 und -4, GDF-5, IGF-I und -II, MMP-3, CTGF. Weiterhin

wurden mit der gleichen Technik die Expression von Kollagen-Typ-I und -II analysiert.

Dieses Verfahren diente als „Screening“. Es konnten keine Aussagen über die Expressionsintensität gemacht werden. Lediglich das Vorhandensein einer Transkriptionsaktivität konnte nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine annähernde Aussage über die Expressionsintensität durch Abgleich mit dem internen Standard β -Aktin gemacht werden.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden im Anschluss per quantitativer Expressionsanalyse BMP-2 und GDF-5 zur eingehenden Untersuchung ausgewählt.

TGF- β 1-3, BMP-2 und -4, MMP-3, CTGF, Kollagen-Typ-I und -II wurden in beiden Kulturverfahren deutlich exprimiert in gleicher Intensität wie der interne Standard β -Aktin. Lediglich bei IGF-I wurde eine sehr niedrige, bei IGF-II gar keine Expression nachgewiesen.

Die genannten Faktoren wurden mit Ausnahme von IGF-I und -II in beiden Zellkulturverfahren in eindeutiger und gleicher Intensität auf transkriptionaler Ebene exprimiert.

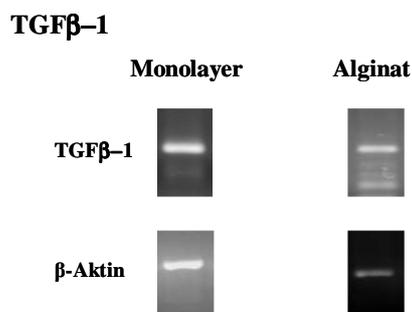


Abbildung 13: Expression von TGF β -1 (161bp) in Monolayer und Alginat, β -Aktin (516 bp) als interner Standard.

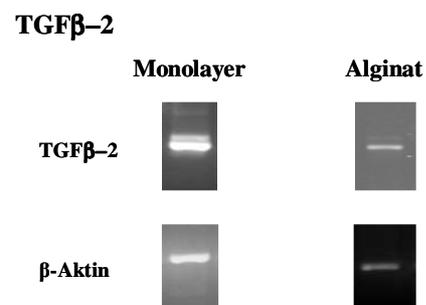


Abbildung 14: Expression von TGF β -2 (503 bp) in Monolayer und Alginat, β -Aktin (516 bp) als interner Standard.

TGFβ-3

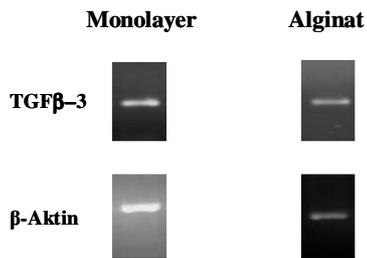


Abbildung 15: Expression von TGFβ-3 (249 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

BMP-2

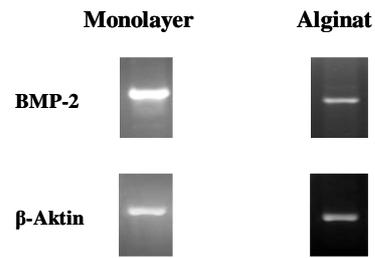


Abbildung 16: Expression von BMP-2 (671 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

BMP-4

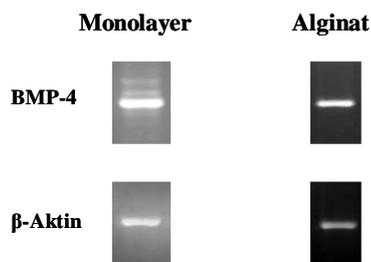


Abbildung 17: Expression von BMP-4 (346 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

GDF-5

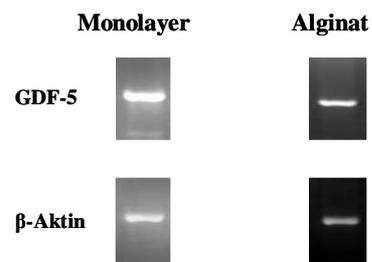


Abbildung 18: Expression von GDF-5 (595 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

IGF-I

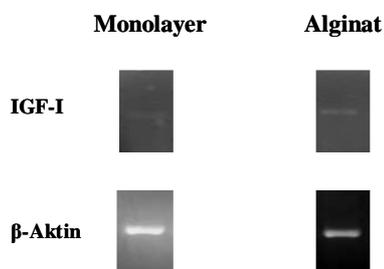


Abbildung 19: Expression von IGF-I (514 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

IGF-II

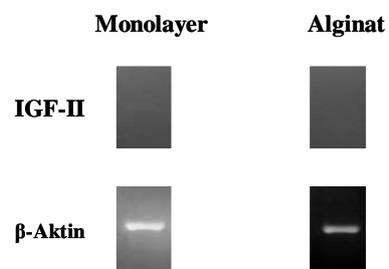


Abbildung 20: Expression von IGF-II (538 bp) in Monolayer und Alginat, β-Aktin (516 bp) als interner Standard.

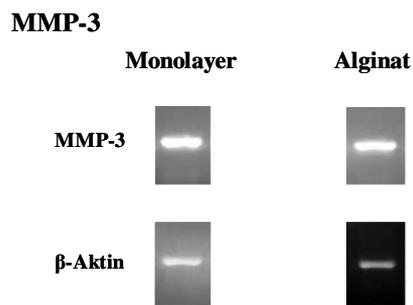


Abbildung 21: Expression von MMP-3 (506 bp) in Monolayer und Alginat, β -Aktin (516 bp) als interner Standard.

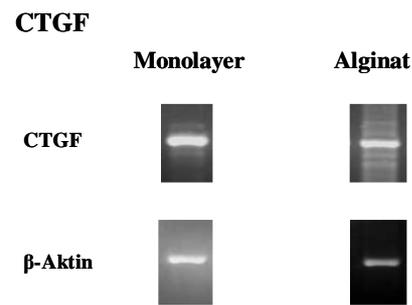


Abbildung 22: Expression von CTGF (483 bp) in Monolayer und Alginat, β -Aktin (516 bp) als interner Standard.

3.7. Vergleich der quantitativen Expression von Kollagen-Typ-II in der Monolayer- und Alginatkultur

Im quantitativen Vergleich der Kollagen-Typ-II Expressionsratio von Zellkulturen fünf verschiedener Spender konnte mit den t-Test für paarige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den in Monolayer und in Alginat kultivierten Zellen festgestellt werden. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die quantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Der t-Wert ist 5.14. Der ttab Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% und 4 Freiheitsgraden ($n-1$; $n=5$) ist 2.776. Da $t > t_{tab}$ ist, sind die Differenzen zwischen den beiden Medien verschieden von Null. Somit bestehen signifikante Unterschiede zwischen beiden Kultursystemen bezüglich der Expression von Kollagen-Typ-II.

Die Expressionsratio von Kollagen-Typ-II ist in Alginat signifikant höher als in der Monolayerkultur. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen, die in der Zellkultur (Zellmorphologie), also auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen, gemacht wurden. Im Rahmen der quantitativen Expressionsbestimmung behalten Chondrozyten in Alginatkultur ihren Differenzierungsstatus in Bezug auf die Kollagen-Typ-II Expression als chondrogene Zellen bei.

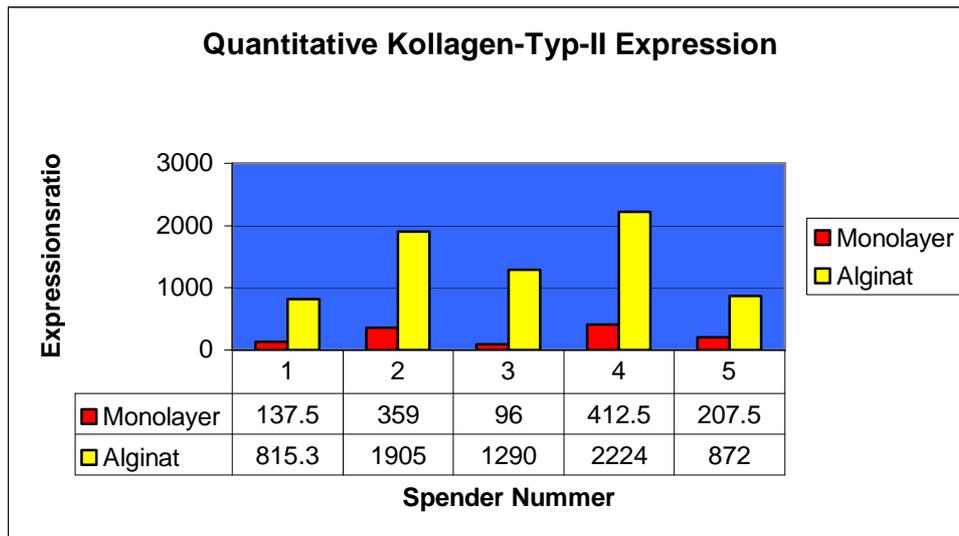


Abb. 23: Quantitative Expression von Kollagen-Typ-II in der Monolayer- und Alginatekultur.

3.8. Vergleich der quantitativen Expression von BMP-2 in der Monolayer- und Alginatekultur

Im quantitativen Vergleich der BMP-2 Expressionsratio von Zellkulturen fünf verschiedener Spender konnte mit dem t-Test für paarige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den in Monolayer und in Alginate kultivierten Zellen festgestellt werden. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die quantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Der t-Wert ist 5.79. Der ttab Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% und 4 Freiheitsgraden ($n-1$; $n=5$) ist 2.776. Da $t > t_{tab}$ ist, sind die Differenzen zwischen den beiden Medien verschieden von Null. Somit bestehen signifikante Unterschiede zwischen beiden Zellkultursystemen bezüglich der Expression.

Die Expressionsratio von BMP-2 ist in Alginate signifikant höher als in der Monolayerkultur. Im Rahmen der quantitativen Expressionsbestimmung behalten Chondrozyten in Alginatekultur ebenfalls ihren Differenzierungsstatus in Bezug auf die BMP-2 Expression bei.

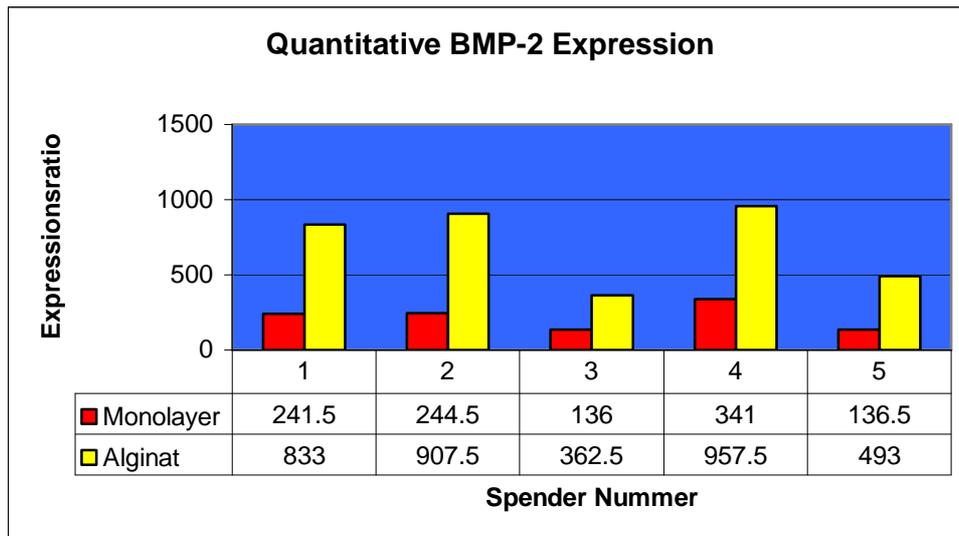


Abb. 24: Quantitative Expression von BMP-2 in der Monolayer- und Alginatkultur.

3.9. Vergleich der quantitativen Expression von GDF-5 in Monolayer- und Alginatkultur

Im quantitativen Vergleich der GDF-5 Expressionsratio von Zellkulturen fünf verschiedener Spender konnte mit dem t-Test für paarige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den in Monolayer und in Alginat kultivierten Zellen festgestellt werden. Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurden die quantitativen Analysen jeweils zweimal durchgeführt.

Der t-Wert ist 5.79. Der ttab Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5% und 4 Freiheitsgraden ($n-1$; $n=5$) ist 2.776. Da $t > t_{tab}$ ist, sind die Differenzen zwischen den beiden Medien verschieden von Null. Somit bestehen signifikante Unterschiede zwischen beiden Zellkultursystemen bezüglich der Expression.

Die Expressionsratio von GDF-5 ist in Alginat signifikant niedriger als in Monolayerkultur. Im Rahmen der quantitativen Expressionsbestimmung behalten unter den von uns untersuchten Bedingungen die Chondrozyten in Alginatkultur ebenfalls ihren Differenzierungsstatus in Bezug auf die GDF-5 Expression bei (Abb.25).

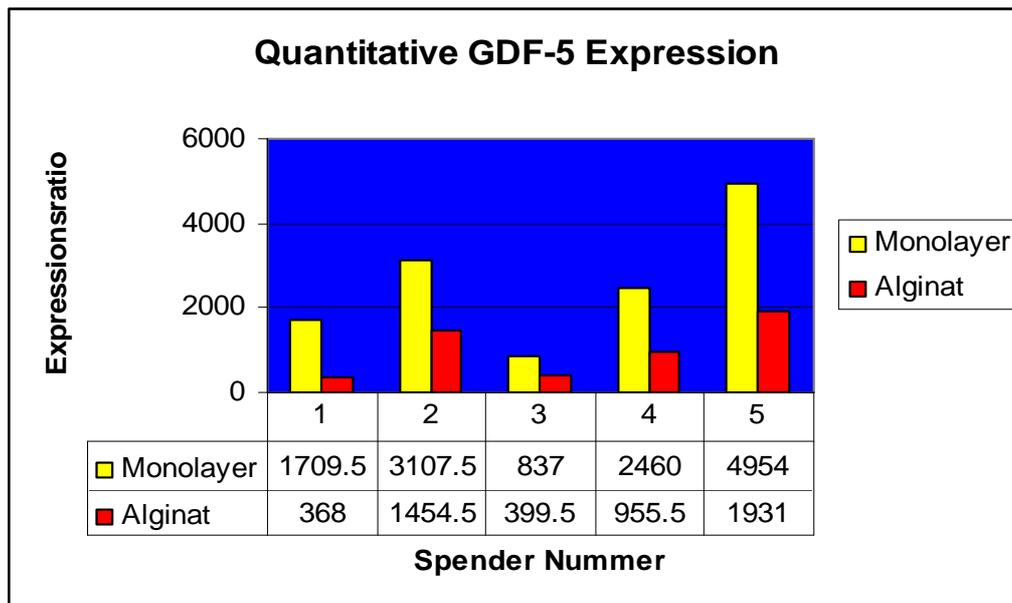


Abb. 25: Quantitative Expression von GDF-5 in Monolayer- und Alginatkultur.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Zellkultur

Humanes Knorpelgewebe wurde von fünf Patienten zur autologen Knorpelzelltransplantation entnommen. Ein Teil dieses Gewebes wurde für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung dieses Gewebes wurde unter strengsten hygienischen Sicherheitsvorkehrungen vollzogen um mögliche Kontaminationen des untersuchten Materials zu verhindern. Es wurden die gleichen Sicherheitsvorkehrungen wie für die zur Retransplantation vorgesehenen autologen Knorpelzellen getroffen.

Die Chondrozyten wurden aus ihrer Gewebematrix herausgelöst und vereinzelt. Die in Monolayerkultur ausgebrachten Zellen bildeten erwartungsgemäß einen einlagigen Zellrasen und nahmen bei ausreichender Kultivierungsdauer ein spindelförmiges Aussehen an als morphologisches Korrelat ihrer

Dedifferenzierung. Die Chondrozyten in Alginatbeads waren in dieser Matrix eingeschlossen und wiesen einen differenzierten rundlichen Phänotyp auf.

DMEM wurde mit weiteren Zusätzen als Nährmedium benutzt. Auf Zugabe von Antibiotika wurde zur Vermeidung möglicher Interferenzen mit dem Wachstumsverhalten der Knorpelzellen verzichtet.

Zellkulturen ermöglichen die eingehende Betrachtung der Auswirkungen von Veränderungen einzelner Parameter. Die komplexen Interaktionen in einem physiologischen Milieu werden reduziert und es kann eine Fokussierung auf spezielle Fragestellungen vollzogen werden. Die vielschichtigen Wechselwirkungen in vivo werden allerdings ausgeblendet. Dies bedeutet einerseits eine reduktionistische Vereinfachung und Abstrahierung von Zusammenhängen, andererseits können gerade dadurch die Untersuchungen als Grundlage und Werkzeug für weiterführende Forschungen in komplexeren Modellen gelten.

Allerdings muss man sich bei derartigen Systemen fortwährend eben diesen vereinfachenden Modellcharakter vor Augen führen und jegliche Ergebnisse lediglich als Grundlage für weiterführende Untersuchungen sehen.

4.1.2. Primärkultur

Es gibt Hinweise darauf, dass Chondrozyten durch Passagieren der Zellkulturen bei der in vitro Expansion in zunehmendem Maße ihre Fähigkeit verlieren, einen qualitativ hochwertigen und stabilen Phänotyp einer artikulären Gelenkknorpelzelle zu bewahren⁷¹.

Um optimale Bedingungen für den Einsatz von Knorpelzellen bei der autologen Chondrozytentransplantation zu erhalten und eine höchstmögliche Qualität der zum Einsatz kommenden Chondrozyten sicherzustellen, ist es daher von Bedeutung auf ein Passagieren bzw. zu viele Populationsverdoppelungen der zu expandierenden Chondrozyten zu verzichten.

Mit Rücksicht darauf wurde für die Untersuchungen die Verwendung von Primärkulturen bevorzugt, um eine Interpretation der Ergebnisse unter den der

autologen Chondrozytentransplantation vergleichbaren Bedingungen zu ermöglichen.

4.1.3. Monolayerkultur

Entzieht man den Chondrozyten die sie umgebende Matrix, wie dies bei der zweidimensionalen Monolayer-Kultur-Technik der Fall ist, so verändern sie ihren Phänotyp dahingehend, dass sie morphologisch Fibroblasten ähnlich werden. Sie nehmen ein längliches spindelförmiges Aussehen an⁷⁹. Durch diesen Prozess der Dedifferenzierung wird auch die Zusammensetzung der synthetisierten Matrix verändert. Die Matrixproduktion wird vorwiegend auf Kollagen vom Typ-I und wenig Proteoglykane umgestellt⁸⁰. Die Produktion von Kollagen-Typ-II, das die Qualität des hyalinen Gelenkknorpels zusammen mit den Proteoglykanen bestimmt, wird reduziert.

Aggrecan wird zunehmend durch nicht aggregierende Proteoglykane ersetzt⁸¹. Mit zunehmender Dedifferenzierung steigt die Syntheserate von Kathepsin L und B, die im differenzierten Zustand sehr niedrig ist. Im Gegensatz dazu wird die Expression von Kollagenase mit zunehmender Subkultivierung und somit Dedifferenzierung heruntergefahren⁸². Die Produktion von TIMP wird hingegen gesteigert⁹³.

Eine weitere Eigenschaft, die isolierte Chondrozyten in der zweidimensionalen Kultur von Chondrozyten in natürlicher Matrix unterscheidet, ist ihre starke mitotische Aktivität. Die isolierten Chondrozyten erweisen sich in diesem veränderten Milieu als äußerst teilungsfreudig.

Die Dedifferenzierung bewirkt auch ein verändertes Ansprechen der Chondrozyten auf Wachstumsfaktoren und Zytokine. Bei fibroblasten-ähnlichen Zellen wirkt Interleukin-1 proliferationssteigernd, bei primären Chondrozyten hingegen proliferationshemmend⁸³. IGF-1 regt in abgeflachten, adhärennten und fibroblasten-ähnlichen Chondrozyten die DNA Synthese an. In sphärischen, den Primärchondrozyten entsprechenden Zellen nicht⁸⁴.

Abgesehen von einzelnen Beispielen ist jedoch noch wenig über die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Zytokinexpression bekannt, die durch den Stress des Matrixentzugs in der Monolayerkultur hervorgerufen werden.

Durch den Entzug des physiologischen Milieus könnten Stressbedingungen geschaffen werden, die denen des Entzuges von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen entsprechen. Den Chondrozyten könnte mit dem Verlust ihrer Matrix ein Medium der Kommunikation untereinander und mit dem restlichen Gelenk genommen werden. Die normale Steuerung der Proliferation und Differenzierung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine könnte außer Kontrolle geraten. Die Mitose hemmenden und Differenzierung fördernden Faktoren scheinen keine Möglichkeit zu finden, ihre Wirkung zu entfalten. Die Übertragungswege für die Ausübung ihrer Kontrollfunktion scheinen ihnen abhanden gekommen zu sein.

Der Matrix-Entzug könnte zu ähnlichen Auswirkungen führen wie die Stressaktivierung durch Entzug von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Jüngste Untersuchungen von stressaktivierten differenzierenden osteogenen und fibrogenen Zellen konnten diese als Produktionsstätten von TGF- β und BMP identifizieren. Diese Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen des Bindegewebes^{85 86}.

Die Einzelheiten, die diese Veränderung der isolierten Chondrozyten in ihrem Phänotyp, ihrer Matrixproduktion und ihrer Mitogenität bewirken, sind bis heute nicht geklärt. Hier liegt möglicherweise ein Schlüssel zum Verständnis der Chondrogenese, der die Therapie von Gelenkknorpeldefekten entscheidend beeinflussen könnte.

4.1.4. Kultur in Alginatbeads

Der Vorteil der Kultur von Chondrozyten in diesem dreidimensionalen System liegt im Erhalt des chondrozytären Phänotyps⁸⁷. Die Alginatkultur kann somit als differenzierungsstabilisierendes System angesehen werden. Den Zellen wird

die Möglichkeit gegeben sich in einer räumlichen Struktur zu entfalten, eine sphärische Morphologie anzunehmen, Matrix zu produzieren und sich zu vermehren. Im Vergleich zur Monolayerkultur ist die Proliferationsrate der Zellen niedriger, allerdings erfahren die Zellen in Monolayerkultur bei fortwährender Kultur und Passagierung eine Dedifferenzierung. Für die erfolgreiche Anwendung der autologen Chondrozytentransplantation besteht nach dem derzeitigen Kenntnisstand eine wesentliche Aufgabe darin, eine ausreichende Zahl von Zellen mit weitgehend erhaltenem Phänotyp anzuzüchten.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieser Aufgabe besteht darin, sich die Vorteile beider Kultursysteme zu Nutze zu machen und diese zu kombinieren. Dies wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die dedifferenzierten Chondrozyten in Monolayerkultur die Fähigkeit besitzen, in dreidimensionalen Kultursystemen wie einem Alginat eine Redifferenzierung zu vollziehen⁷³.

Alginat ist ein lineares Copolymer, das aus Braunalgen gewonnen wird. Es besteht aus α -L-Guluron- und D-Mannuronsäure, welche durch eine α -1,4 glykosidische Bindung verbunden werden. In Anwesenheit von divalenten Kationen wie zum Beispiel Kalzium vollzieht das Polymer eine sofortige ionotrophe Gelierung. Dadurch ist eine homogene Zellverteilung im entstandenen Gel möglich.

Ein weiterer Vorteil dieses Gels für seine Verwendung für Zellkulturen liegt in der verhältnismäßig einfachen Auflösung der Gelstruktur in die monomeren Untereinheiten durch chelatierende Faktoren wie beispielsweise Zitrat oder EDTA. Durch Zentrifugation können die Zellen dann relativ einfach aus dem aufgelösten Alginat wiedergewonnen werden für zell- und molekularbiologische Analysen.

Wie bereits bekannt ist und mit den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden konnte, bilden Chondrozyten im Alginatgel ihre in vivo typische sphärische Zellmorphologie aus. Eine Phänotyp stabilisierende Wirkung auf Chondrozyten konnte somit, wie bereits für chondrogene Zellen unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen wurde, bestätigt werden. Darüber hinaus übt Alginat eine redifferenzierende Wirkung auf zuvor dedifferenzierte Chondrozyten aus. Dies ist wahrscheinlich durch die strukturelle Ähnlichkeit

(speziell der Ladungsdichte) des Alginatgels mit knorpeltypischen Proteoglykanen zu erklären.

Humane Knorpelzellen adulter Spender synthetisieren im Alginat eine extrazelluläre Matrix, die der Zusammensetzung der nativen Knorpelmatrix sehr nahe kommt.

Die hohe Kalziumkonzentration beim Gelierungsvorgang und die Diffusion von Nährstoffen in die dichte poröse Struktur des Alginatgels könnten allerdings einen hemmenden Einfluss auf den Metabolismus der kultivierten Zellen haben. Insgesamt kann jedoch davon ausgegangen werden, dass ein Alginatgel gute Bedingungen für in vitro Untersuchungen von Chondrozyten bietet. Insbesondere die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und der knorpeltypischen Matrixsynthese ist vorteilhaft. Die Herstellung von perizellulärer Matrix, wie sie in Alginatgel beobachtet wird, könnte ebenfalls zu einer erhöhten mechanischen Belastbarkeit von Implantaten führen. Dies wurde für Chondrozyten, die in Agarosekulturen gehalten wurden bereits nachgewiesen⁸⁸.

Trotz ihrer ausgezeichneten in vitro Eigenschaften sind die Ergebnisse von Alginat als Biomaterial für die biologische Knorpelrekonstruktion in vivo bisher enttäuschend. Es besitzt wenig geeignete Resorptionseigenschaften und hat in Tierexperimenten zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpelschäden erhebliche Immun- und Fremdkörperreaktionen verursacht⁸⁹. Es wurde daher noch nie als Trägermaterial für die Transplantation chondrogener Zellen beim Menschen verwendet.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wird Alginat in vitro oft als Biomaterial für die Erforschung regulativer Signalmechanismen der Chondrogenese oder auch der Arthroseentstehung verwendet.

4.1.5. RNA Extraktion

Zur RNA Extraktion wurde das RNEasy-Kit der Firma Qiagen verwendet. Ein spezifisches Puffersystem bestehend aus hochkonzentrierten Salzpuffern

ermöglicht die Fixierung von bis zu 100µg RNA pro Durchgang an eine Silikatgel-Membran.

Vor der Extraktion müssen die Proben lysiert und homogenisiert werden. Hierzu wird ein stark denaturierender Puffer (RLT) mit Guanidium Isothiocyanat (GITC) als Wirkstoff eingesetzt. Dieser GITC-Puffer bewirkt eine sofortige und effektive Inaktivierung von RNase und ermöglicht somit die Gewinnung einer intakten RNA. Anschließend wird Ethanol hinzugefügt, um eine suffiziente Anbindung der RNA an der Gelmembran zu gewährleisten. Das Gemisch wird in eine dafür vorgesehene Zentrifugationssäule aufgetragen und dann zentrifugiert. Es schließt sich ein Waschvorgang mit erneuter Zentrifugation an und letztlich wird die RNA von der Membran durch RNase freies Wasser losgelöst. Die gewonnene RNA-Lösung wird in einem Eppendorf Cup aufgefangen.

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Extraktion ist die vorausgehende Lysierung und Homogenisierung der Proben, da es sich bei RNA um intrazelluläres Material handelt. Zur Lysierung und Spaltung der Zellmembran wurde der GITC-entaltende RLT Puffer eingesetzt. Dieser Schritt ist wichtig um alle intrazelluläre RNA durch Auflösung der Zellmembran zu erhalten. Die Homogenisierung reduziert die erhöhte Viskosität, die durch die Lysierung der Zellen entstanden ist. Die Homogenisierung wurde durch wiederholtes Aspirieren des Zellysates durch eine 25er Nadel erreicht.

Der Hauptvorteil dieser Extraktionsmethode ist, dass sie äußerst zügig im Vergleich zu anderen Techniken vollzogen werden kann. Die Einarbeitung in die Technik ist schnell, und durch ihre Einfachheit bietet sie wenig Fehlermöglichkeiten. Die isolierte RNA kann außerdem umgehend der cDNA Synthese zugeführt werden.

Das immer bestehende Kontaminationsrisiko mit dem RNA spaltendem Enzym RNase, lässt sich mit dieser Methode zwar verringern, ist jedoch nicht völlig auszuschalten. Diesem Risiko wurde durch Verwendung spezieller Arbeitsmittel begegnet. So kam bei der Extraktion und der anschließenden cDNA-Synthese ein separater RNase-freier Pipettensatz zum Einsatz. Weiterhin wurden sterile Gefäße, RNase-freie Chemikalien und sterile Pipetten verwendet. Latex-Handschuhe wurden während aller Arbeitsschritte getragen. Sterilität muss bei

der RNA- Extraktion, der cDNA-Synthese und der PCR nicht eingehalten werden.

Äquivalente Mengen zur cDNA Synthese wurden durch konstante, mittels voriger Zählung nachgewiesener Zellzahlen, erreicht. Dadurch waren die Ergebnisse der anschließenden PCR untereinander vergleichbar.

4.1.6. Synthese der cDNA

An die Extraktion der RNA wurde umgehend die reverse Transkription angeschlossen. Eine Kryokonservierung der RNA wurde vermieden, um das Risiko einer Ausfällung der RNA Sequenzen durch Einfrieren und Auftauen auszuschließen.

Zur reversen Transkription der Proben wurde immer der gleiche Kit eines Herstellers eingesetzt. Dieser Kit unterliegt zur Gewährleistung eines gleich bleibenden Qualitätsstandards einer strengen Kontrolle durch den Hersteller.

Zum Zeitpunkt der reversen Transkription werden stets dieselben Reagenzienmischungen für die jeweiligen Proben eines Patienten verwendet. Die cDNA Synthese wurde in einem PCR-Block durchgeführt, der konstante Temperaturbedingungen gewährleistete.

Identische Bedingungen für die reverse Transkription wurden somit sichergestellt.

4.1.7. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die gewonnene cDNA wurde anhand der Polymerasenkettenreaktion auf die Expression verschiedener Gene untersucht. Als Ausgangsmaterial für die cDNA diente mRNA.

Die Problematik der Interpretation des von uns untersuchten Expressionsverhaltens spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von Chondrozyten unter verschiedenen Zellkultivierungsverfahren liegt in den Beschränkungen der verwendeten Untersuchungsmethode.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit von kultivierten Zellen gewonnener mRNA, die durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, und mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden Faktoren, erlaubt lediglich eine Momentaufnahme der Produktion des eigentlichen Endproduktes der Genexpression, dem Wachstumsfaktor als Protein. Es kann nur eine Aussage über die Expression der mRNA getroffen werden. Aussagen über die tatsächliche mRNA Menge des zu untersuchenden Genes im Vergleich zu internen und externen Standards sind auch nicht möglich, da in den vorliegenden Untersuchungen ausschließlich die Methode der Endpunkt-PCR verwendet wurde. Die eigentliche Produktion des Proteins kann damit nicht beurteilt werden.

Weiterhin bietet die Amplifikation der Gensequenz bei der RT-PCR zahlreiche Variationsmöglichkeiten bezüglich der Stärke der Amplifikation. Um die Variationsbreite einzuschränken, wurden standardisierte Mengen an cDNA eingesetzt. Ein in Vorversuchen optimiertes Protokoll zur Herstellung des PCR Reagenzienmixes wurde als Standard für alle Versuche angewendet. Um Anhaltspunkte über die Amplifikationsstärke zu erhalten, wurde das „housekeeping“ Gen β -Aktin als interner Standard bei jedem Versuch parallel amplifiziert. Dieses Gen eignet sich als interner Standard, da es ubiquitär in humanen Zellen vorkommt und nahezu keiner Regulation seiner Expression unterliegt.

Spezifische Primer für die untersuchten Sequenzen wurden in Vorversuchen auf die optimalen Annealing Temperaturen untersucht. Hinsichtlich der Anzahl der Amplifikationswiederholungen wurde zur Optimierung der Ergebnisse darauf geachtet, dass sich die Amplifikationskurven noch in der exponentiellen Phase befanden. Die Plateauphase, die sich bei Sättigung einzelner Reaktionspartner ergibt und keine verlässlichen Aussagen bezüglich vorhandener Unterschiede der Expression zulässt, wurde somit vermieden. Die Funktionsfähigkeit und Spezifität der Primer wurde, wo möglich, mit Positivkontrollen, ansonsten durch visuelle Kontrolle der Basenpaarlänge der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese sichergestellt. Zur

Feststellung der Reinheit der Reagenzienmischungen und zur Kontrolle auf etwaige Kontaminationen wurden stets Negativkontrollen mitamplifiziert.

Der verwendete PCR-Block gewährleistete konstante Temperaturbedingungen, konstante Längen der einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion und konstante Zyklenzahl für die spezifischen Primer.

Die RT-PCR Methode kann aufgrund der oben aufgeführten Gründe nur als Screeningmethode angesehen werden, hat sich jedoch als solche, bei Beachtung einer weitgehenden Standardisierung der einzelnen Teilaspekte, als relativ aussagekräftig und zuverlässig bewährt.

Die Feststellung einer Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf mRNA-Ebene lässt keinen Rückschluss zu auf eine eventuell stattfindende posttranslationale Modifikation oder auf die vielfältigen Interaktionen mit den diversen Rezeptoren der Zielzellen für diese Faktoren. Die Komplexität der intrazellulären Signaltransduktion hat einen wesentlichen Einfluss auf die Effekte der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Dies kann jedoch mit der verwendeten Methodik ebenfalls nicht erfasst werden.

Um eine vollständige Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Kultivierungsverfahren auf die Produktion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu ermöglichen, bedarf es einer quantitativen Untersuchung aller Regulations- und Produktionsschritte dieser Faktoren. Dies muss als Grundlage angesehen werden für das Verständnis des Einflusses dieser Faktoren auf die Biosynthese von extrazellulärer Matrix, den Metabolismus und das Wachstum von artikulärem Knorpelgewebe.

4.1.8. Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid (EtBr) besteht darin, dass dieser Markierungsstoff an die DNA-Moleküle bindet und bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert. PCR-Produkte lassen sich damit visualisieren und die Intensität der einzelnen Banden lässt bei standardisierten

PCR-Bedingungen eine analoge Aussage über das Ausmaß der Transkription der untersuchten Faktoren zu. Die Intensität der spezifischen Banden dient als Indikator für die Regulation der Genexpression und ermöglicht die Darstellung qualitativer und semiquantitativer Unterschiede. Die Position der einzelnen Banden wird in Relation zu einem mit aufgetragenen Eichmarker gesetzt und lässt eine Bestimmung der Basenpaarlängen zu. Die Spezifität der dargestellten Signalbanden ist somit gewährleistet.

Ein Gesundheitsrisiko dieser Technik ist die mutagene Eigenschaft von EtBr. Da dieser Stoff durch Latex diffundiert wurden beim Umgang mit ihm spezielle Handschuhe aus EtBr undurchlässigem Nitril verwendet.

Die nach der Elektrophorese im Gel visualisierten PCR-Produkte wurden zur Dokumentation digital mit einer Videokamera und angeschlossenem Computer mit spezieller anwendungsbezogener Software gespeichert.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Der therapeutischen Herausforderung der Regeneration von Gelenkknorpeldefekten wird in zunehmendem Maße durch die Transplantation von in vitro kultivierten chondrogenen Zellen begegnet. Um dieses Verfahren zu optimieren, bedarf es eines umfassenden Verständnisses der Biologie des Gelenkknorpels auf zell- und molekularbiologischer Ebene. Der Vorgang der Differenzierung der chondrogenen Vorläuferzelle und durch welche Faktoren er beeinflusst wird, hat hierbei einen hohen Stellenwert. Der Bedeutung, der mito- und morphogenen Zytokine hinsichtlich Proliferation und Differenzierung gilt hier das Hauptaugenmerk.

Experimentelle Untersuchungen zur Chondrozytendifferenzierung konnten zeigen, dass die embryonale Chondrogenese durch eine abgestimmte Abfolge von Einflüssen von Genen und löslichen Signalstoffen gesteuert wird⁹⁰. Dieselben Vorgänge könnten bei Knorpelwachstum und Regeneration auch im späteren Leben stattfinden.

Die Chondrogenese hängt außerdem stark von dem die Chondrozyten umgebenden Milieu ab. In ihrer natürlichen Umgebung stehen sie in engem symbiotischen Wechselspiel mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix.

Die Steuerung der Proliferations- und Differenzierungsvorgänge wird in diesem Medium geregelt. Aber auch die Signale an die Chondrozyten zur Aufrechterhaltung der Matrixproduktion selbst werden hier an die sonst isolierten Zellen übertragen.

Der Zweck unserer Analysen war es deshalb, die Biologie reifer Chondrozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsverfahren zu untersuchen.

Als Untersuchungsmethoden dienten uns Histologie, Immunhistologie und Genexpression verschiedener Markergene deduziert durch deren qualitative und quantitative mRNA-Messung.

Die Untersuchung der Expression der Markergene der Matrixproteine Kollagen-Typ-I und -II zeigte signifikante patientenabhängige Unterschiede bei frisch isolierten Chondrozyten ohne vorherige Zellkultur. Die zugrunde liegende Qualität des Knorpelgewebes im Hinblick auf das Differenzierungsstadium der Chondrozyten ist von entscheidender Bedeutung für die Fähigkeit der Zellen in vivo wieder zum chondrogenen Phänotyp zu redifferenzieren. Die quantitative Expression von knorpelspezifischen Proteinen oder Markergenen korreliert nach dem derzeitigen Wissensstand mit der Fähigkeit der Zellen zur Redifferenzierung^{70 75 91}. Zur Bestimmung der quantitativen Expression eignet sich die quantitative Analyse knorpelspezifischer Messenger-RNA, wie die Alpha-1-Kette des Kollagen-Typ-II und dessen Bezug zum Spiegel der mRNA der Alpha-2-Kette von Kollagen-Typ-I⁹². Hierbei sollte idealerweise auf mRNA-Ebene ein deutlicher Überschuss von Kollagen-Typ-II nachweisbar sein⁸⁹.

Vor dem Hintergrund des therapeutischen Einsatzes der expandierten Chondrozyten könnte die Qualität der Zellen im Hinblick auf ihr Differenzierungsstadium somit einen prädiktiven Wert über den Erfolg einer autologen Chondrozytentransplantation darstellen. Wenn man also annimmt, dass die zugrunde liegende Qualität des kartilaginären Phänotyps, einen Einfluss auf die Qualität des kultivierten Zellmaterials und dessen Redifferenzierungspotenzial hat, könnte dies auch die variablen klinischen

Ergebnisse dieses Verfahrens erklären. Anzustreben ist die Verwendung möglichst hoher Zellzahlen bei hoher Zellvitalität und einer maximalen Fähigkeit zur Synthese knorpeltypischer mRNA.

Es ist bereits bekannt, dass die Kultivierung von Chondrozyten in Monolayerkultur zur Dedifferenzierung des Phänotyps führt. Unsere Untersuchungsergebnisse bestätigten, dass in zweidimensionaler Monolayerkultur bei zunehmender Kultivierungsdauer und Passagenzahl histomorphologisch eine deutliche Dedifferenzierung stattfindet. Die Chondrozyten wandelten ihre differenzierte sphärische Morphologie zu einer dedifferenzierten, fibroblasten-ähnlichen Erscheinungsgestalt. Zusätzlich fand eine deutliche Proliferation statt. Hingegen bewahrten die Chondrozyten in einer dreidimensionalen, Alginkultur ihre typisch sphärische Form.

Als qualitativer Marker für einen differenzierten Phänotyp ist das Matrixprotein Kollagen-Typ-II akzeptiert. Quantitative Untersuchungen konnten bestätigen, dass die mRNA Expression der Alpha-1-Kette des Kollagen-Typ-II in Monolayerkultur reduziert wird. Die damit einhergehende Zunahme der Expression von der mRNA der Alpha-2-Kette von Kollagen-Typ-I bestätigt ebenfalls den bereits bekannten Prozess beginnender Dedifferenzierung der Chondrozyten in 2D-Kultur in vitro.

In der Alginkultur hingegen konnte quantitativ wiederum eine signifikant höhere Expression der Alpha-1-Kette des Kollagen-Typ-II nachgewiesen werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigte die Dedifferenzierung der Chondrozyten in Monolayerkultur in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Kollagen-Typ-II konnte in der perizellulären Matrix immunhistologisch nicht mehr nachgewiesen werden.

In der Alginkultur hingegen konnte eine deutliche Anfärbung der perizellulären Matrix für Kollagen-Typ-II nachgewiesen werden.

Die Expressionsanalyse mittels RT-PCR der untersuchten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren TGF- β 1-3, BMP-2 und -4, GDF-5, CTGF, IGF-I und -II und MMP-3 konnte bei den vorliegenden Untersuchungsbedingungen keine deutlich erkennbaren Unterschiede zwischen Monolayer- und Alginkultur

aufzeigen. IGF-II konnte bei keinem von beiden Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden. Es könnte daher sein, dass es nicht zum Expressionsmuster einer differenzierten Knorpelzelle gehört.

Exemplarische quantitative Expressionsanalysen von BMP-2 und GDF-5 konnten jeweils gegenläufige Expressionsmuster dieser Wachstums- und Differenzierungsfaktoren nachweisen.

In der Alginatkultur wurde im Vergleich zur Monolayerkultur BMP-2 signifikant höher exprimiert. Im Zusammenhang mit den bereits dargelegten Ergebnissen der histologischen, immunhistologischen Untersuchungen und der quantitativen Expressionsanalysen von Kollagen-Typ-II deutet dies auf eine spezifische Expression bei differenzierten Chondrozyten hin.

Die quantitative Expressionsanalyse von GDF-5 zeigte hingegen eine signifikant höhere Expression in der Monolayerkultur. Bei der Skelettentwicklung ist GDF-5 vor allem für das frühkartilaginäre Entwicklungsstadium von besonderem Stellenwert³¹. Eine erhöhte Expression in der Monolayerkultur bei phänotypisch und expressionsanalytisch einsetzender Dedifferenzierung könnte unter unseren Bedingungen somit auf eine „Regression“ der Chondrozyten auf ein früheres Stadium der Differenzierung bei der Skelettentwicklung hindeuten.

Beide Faktoren, BMP-2 und GDF-5, können jeweils spezifisch als Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsmarker zur Beurteilung der Chondrozyten verwendet werden.

Als Ergebnis dieser Beobachtungen kann festgestellt werden, dass GDF-5 und BMP-2 ebenso wie Kollagen-Typ-II als Qualitätsmerkmal zur Feststellung des Differenzierungsstadiums und daher auch zur biologischen Güte von kultivierten Chondrozyten verwendet werden können. Dies hat einen besonderen Stellenwert zur Festlegung von Qualitätsrichtlinien beim therapeutischen Einsatz im Rahmen der autologen Chondrozytenimplantation.

Aus der Gesamtheit unserer sich ergänzenden Untersuchungsergebnisse lässt sich die biologische Wichtigkeit einer möglichst physiologischen, das heißt dreidimensionalen Matrix (z.B. in Form der Alginatkultur), untermauern.

Eine solche gewährt am ehesten die Bereitstellung differenzierter Chondrozyten mit der Fähigkeit, Matrix zu bilden und im therapeutischen Einsatz als autologe Chondrozytentransplantation ein biologisch hochwertiges Ersatzgewebe mit vergleichbaren Eigenschaften wie natives Knorpelgewebe herzustellen.

Daraus ergibt sich die berechtigte Forderung, bei der Chondrozytenkultivierung vorzüglich oder ausschließlich dreidimensionale Kultivierungsverfahren zu verwenden.

2. Zusammenfassung

Es konnte die bereits bekannte, einsetzende Dedifferenzierung der Chondrozyten in Monolayerkultur anhand histologischer, immunhistologischer und expressionsanalytischer Methoden bestätigt werden.

Ebenso konnte phänotypisch und expressionsanalytisch der Erhalt des differenzierten Chondrozyten in der dreidimensionalen Kultur in Alginate nachgewiesen werden.

Die quantitative Expressionsanalyse frisch isolierter, nicht in Zellkultur ausgebrachter, Chondrozyten zeigte signifikante patientenabhängige Differenzen im Hinblick auf die Expression des Matrixproteins Kollagen-Typ-II. Dies kann einen wichtigen Hinweis auf die zugrunde liegende Qualität des Biopsiematerials geben. Die Zellqualität könnte einen erheblichen Einfluss auf die therapeutischen Erfolgsaussichten bei der autologen Chondrozytentransplantation haben.

Unter den vorliegenden Untersuchungsbedingungen konnten Expressionsanalysen keine mRNA Differenzen bei den untersuchten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren TGF- β 1-3, BMP-2 und -4, IGF-I und -II, MMP-3, GDF-5 und CTGF zeigen.

Quantitative Expressionsanalysen von BMP-2 und GDF-5 zeigten signifikante Unterschiede. BMP-2 könnte als Differenzierungsmarker und GDF-5 als Dedifferenzierungsmarker verwendet werden.

Insbesondere für den therapeutischen Einsatz bei der autologen Chondrozytentransplantation scheint eine Standortbestimmung bezüglich der Qualität des vorhandenen Zellmaterials von Bedeutung, da dies durchaus prognostischen Charakter für den therapeutischen Erfolg haben könnte. Eine derartige Qualitätsanalyse könnte nach den hier vorliegenden Ergebnissen neben phänotypischer Analyse eben auch die quantitative Expressionsanalyse von Kollagen-Typ-II, BMP-2 und GDF-5 umfassen.

6. Literaturverzeichnis:

¹ Minas T., Nehrer S. (1997): Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 20: 525-538

² Schenk R. C.; Goodnight J. M. (1996): Current concepts review osteochondrosis dissecans. *J Bone and Joint Surg.*, 78: 439-456

³ Erggelet, C.; Steinwachs M.; Reichelt A.: Die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. *Dt. Ärztebl.* 95 (1998) A1379-1382 (Heft 22)

⁴ Mankin, H. J.: Current Concept review. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone and Joint Surg.*, 64-A: 460-466, 1982

⁵ Hunter W: On structure and diseases of articulating cartilage. *Philos Trans R Soc Lond* 24B:514-521, 1743

⁶ Gaissmaier C, Fritz J, Schewe B, Weise K, Mollenhauer J, Aicher WK: Cartilage defects. *Epidemiology and Natural History. Osteosynthesis and Trauma Care* 2005, in press.

⁷ Pritzker KPH: Cartilage histopathology in human and rhesus macaque osteoarthritis In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, editors. *Articular cartilage and osteoarthritis* New York, USA 1992: Raven Press, ISBN 0-88167-862-7.

⁸ von der Mark K, Kirsch T, Aigner T, Reichenberger E, Nerlich A, Weseloh G, Stöß H. 1992. The fate of chondrocytes in osteoarthritic cartilage: regeneration, dedifferentiation, or hypertrophy? In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, editors. *Articular cartilage and osteoarthritis* New York, USA 1992: Raven Press, ISBN 0-88167-862-7.

-
- ⁹ Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ. 2001. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression J Orthop Res 19: 1140-1146.
- ¹⁰ Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. 2001. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes Connect Tissue Res 42: 71-86.
- ¹¹ D`Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW Jr, Lotz MK. 2001. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury Osteoarthritis Cartilage 9: 712-719.
- ¹² Buckwalter J. A.: Articular cartilage. Instr Course Lect 32: 349-370, 1983
- ¹³ Buckwalter J.A.; Hunziker E.; Rosenberg L.; et al: Articular cartilage: Composition and structure, in Woo S.L.-Y.; Buckwalter J.A. (Editors): Injury and repair of the Musculoskeletal Soft Tissues. Park Ridge, IL, AAOS, pages 405-425, 1988
- ¹⁴ Buckwalter J.A.; Mankin H.J.: Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interaction. J Bone Joint Surg 79A: 600-611, 1997
- ¹⁵ Brenner R.E.; Nerlich A.; Heinze E.; Vetter U.; Teller W.M.: Different regulation of clonal growth by transforming growth factor β -1 in human fetal articular and costal chondrocytes. Pediatr Res 33: 390-393, 1993
- ¹⁶ Villiger P.M.; Lotz M.: Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. J Cell Physiol 1992 151 (2): 318-325, 1992
- ¹⁷ Haudenschild D.R.; Brown M.E.; Gagne J.M.; McPherson R.A.; Tubo R.A.; Vasios G.; Binette F.: Connective tissue growth factor expression during articular chondrocyte growth and differentiation. ICRS, 2nd Symposium International Cartilage Repair Society, 16.-18. November 1998, Boston USA.
- ¹⁸ Guerne P.A.; Sublet A.; Lotz M.: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes and fibroblasts. J Cell Physiol 158 (3): 476-484, 1994
- ¹⁹ Moses H. L.; Serra R.: Regulation of differentiation by TGF β . Curr Opin Genet Dev Oct;6(5):581-6, 1996
- ²⁰ Brenner R.E.; Nerlich A.; Heinze E.; Vetter U.; Teller W.M.: Different regulation of clonal growth by transforming growth factor- β 1 in human fetal articular and costal chondrocytes. Pediatr Res Apr;33(4 Pt 1):390-393, 1993

-
- ²¹ Hui W.; Rowan A.D.; Cawston T.: Transforming growth factor beta1 blocks the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage stimulated by oncostatin M in combination with IL-1alpha. *Cytokine* 12 (6): 765-769, 2000
- ²² van Beuningen H.M.; Glansbeek H.L.; van der Kraan P.M.; van den Berg W.B.: Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 6(5): 306-317, 1998
- ²³ Sakou T.; Onishi T.; Yamamoto T.; Nagamine T.; Sampath T.K.; Ten Dijke P.: Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 14 (7): 1145-1152, 1999
- ²⁴ Sailor L.Z.; Hewick R.M.; Morris E.A.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* 14(6): 937-945, 1996
- ²⁵ Duprez D.; Bell E.J.; Richardson M.K.; Archer C.W.; Wolpert L.; Brickell P.M.; Francis-West P.H.: Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 57(2): 145-157, 1996
- ²⁶ Valcourt U.; Ronziere M.C.; Winkler P.; Rosen V.; Herbage D.; Mallein-Gerin F.: Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12, 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line. *Exp Cell Res* 251 (2): 264-274, 1999
- ²⁷ Stewart M.C.; Saunders K.M.; Burton-Wurster N.; Macleod J.N.: Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effect of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* 15 (1): 166-174, 2000
- ²⁸ Spiro R.C.; Liu L.-S.; Heidarman M.A.; Thompson A.Y.; Ng, C.K.; Pohl J.; Poser J.W.: Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5. *Biochem. Soc Trans* 28, 362-368, 2000
- ²⁹ Storm E. E.; Kingsley D. M.: GDF5 Coordinates bone and joint formation during digital development. *Dev Biol* 209 (1): 11-27, 1999
- ³⁰ Ganan Y.; Macias D.; Duterque-Coquillaud M.; Ros M.A.; Hurler J.M.: Role of TGF betas and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122, 2349-2357, 1996
- ³¹ Macias D.; Ganan Y.; Sampath T.K.; Piedra M.E.; Ros M.A.; Hurler J.M.: Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124: 1109-1117, 1997

-
- ³² Francis-West P.H.; Abdelfattah A.; Chen P.; Allen C.; Parish J.; Ladher R.; Allen S.; MacPherson S.; Luyten F.P.; Archer S.W.: Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126 (6): 1305-1315, 1999
- ³³ Erlacher L.; McCartney J.; Piek E.; ten Dijke P.; Yanagishita M.; Oppermann H.; Luyten F.P.: Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13(3): 383-392, 1998
- ³⁴ Bork P.: The modulator architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* 327: 125-130, 1993
- ³⁵ Bradham D.M.; Igarashi A.; Porter R.L.; Grotendorst G.R.: Connective tissue growth factor: A cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114: 1285-1294, 1991
- ³⁶ Frazier K.; Williams S.; Kothapalli D.; Klapper H.; Grotendorst G.R.: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107: 404-411, 1996
- ³⁷ Brigstock D.R.: The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 2, 189-206, 1999
- ³⁸ Igarashi A., Nashiro K., Kikuchi K., Sato S., Ihn H., Grotendorst G.R., Takehara K.: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* Aug;105(2):280-4, 1995
- ³⁹ Duncan M.R.; Frazier K.S.; Abramson S.; Williams S.; Klapper H.; Huang X.; Grotendorst G.R.: Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β -induced collagen synthesis: downregulation by cAMP. *FASEB J* 13, 1774-1786, 1999
- ⁴⁰ Kothapalli D.; Hayashi N.; Grotendorst G.R.: Inhibition of TGF β -stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 12, 1151-1161, 1998.
- ⁴¹ Nakanishi T., Kimura Y., Tamura T., Ichikawa H., Yamaai Y., Sugimoto T., Takigawa M.: Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 234(1):206-10, 1997

-
- ⁴² Nishida T.; Nakanishi T.; Shimo T.; Asano M.; Hattori T.; Tamatani T.; Tezuka K.; Takigawa M.: Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun* 247, 905-909, 1998
- ⁴³ Trippel S.B.: Potential role of insuline like growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Suppl* 355: 301-313, 1998
- ⁴⁴ Trippel S.B.: Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43: 129-132, 1995
- ⁴⁵ Martin J.A.; Buckwalter J.A.: The role of chondrocyte-matrix ineractions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 37: 129-140, 2000
- ⁴⁶ van Susante J.L.; Buma P.; van Beuningen H.M.; van den Berg W. B.; Veth R.P.: Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. *J Orthop Res* 18 (1): 68-77, 2000
- ⁴⁷ Loeser R.F.; Shanker G.: Autocrine stimulation by insuline-like growth factor 1 and insuline-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro. *Arthritis Rheum* 43: 1552-1559, 2000
- ⁴⁸ Martell-Pelletier J.; Di Battista J.A.; Lajeunesse D.; Pelletier J.P.: IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 47 (3): 90-100, 1998
- ⁴⁹ Aydelotte M.B.; Schumacher B.L.; Kuettner K.E.: Heterogeneity of articular chondrocytes, in Kuettner K.E.; Schleyerbach R.; Peyron J.G.; et al (Editors): *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York, Raven Press, p. 237-249, 1992
- ⁵⁰ Poole C.A.; Flint M.H.; Beaumont B.W.: Morphological and functional interrelationship of articular cartilage matrices. *J Anat* 138: 113-138, 1984
- ⁵¹ Hunziker E. B.; Rosenberg L. C.: Repair of partial-thickness articular cartilage defects. Cell recruitment from the synovium. *J Bone and Joint Surg.*, 78-A: 721-733, 1996
- ⁵² Mankin H. J.: The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *N Engl J Med* 1974; 291: 1285-1295
- ⁵³ Meachim G.: The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J Bone and Joint Surg. [Br]*, 45-B:150-161, 1963
- ⁵⁴ Hunziker E. B.: Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 15-28, 1999

-
- ⁵⁵ Namba R. S.; Meuli M.; Sullivan K. M.; Le A. X.; Adzick N. S.. Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. *J Bone and Joint Surg.*, 80-A: 4-10, 1998
- ⁵⁶ Altman R. D.; Kates J.; Chun L. E.; Dean D. D.; Eyre D.: Preliminary observations of chondral abrasion in a canine model. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1056-1062
- ⁵⁷ Bobic V.: Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen. *Orthopäde* 28: 19-25, 1999
- ⁵⁸ Shapiro F.; Koide S.; Glimcher M. J.: Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone and Joint Surg.* 75-A: 532-553, 1993
- ⁵⁹ Rosenberg L.; Hunziker E. B.: Cartilage repair in osteoarthritis. The role of dermatan sulfate proteoglycans, In: Kuettner K. E., Goldberg V, Eds. *Osteoarthritic Disorders. American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1995: 341-356
- ⁶⁰ Metsaranta M.; Kujala U. M.; Pelliniemi L.; Ostermann H.; Aho H.; Vurio E: Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Matrix Biology* 15: 39-47, 1996
- ⁶¹ O'Driscoll S. W.: Current Concepts Review: The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone and Joint Surg.* 80-A: 1795-1812, 1998
- ⁶² O'Driscoll S. W.: Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orthop* 367: 186-203, 1999
- ⁶³ Gaissmaier C. et al: Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. *Dtsch Arztebl* 2003; 100: A 2448-2453 [Heft 38]
- ⁶⁴ Brittberg M.; Lindahl A.; Nilsson A. et al.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895, 1994
- ⁶⁵ Peterson L.: Autologous chondrocyte transplantation. AAOS 65th Annual Meeting, New Orleans, USA, 1998
- ⁶⁶ Erggelet C, Anderson AF, Arciero R, Browne JE, Fu F, Mandelbaum B, Micheli L, and Moseley B. Marrow stimulation techniques versus autologous chondrocyte implantation for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: comparison of patient outcomes at 3-5 years 4th ICRS Symposium Transactions. 15 – 18 June 2002, Toronto, Canada.

-
- ⁶⁷ Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Lohnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Noth U, Perka C, Richter W, Schafer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K: Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2004; 142: 529-539
- ⁶⁸ 4th Symposium of the ICRS (International Cartilage Repair Society) 15-18 June 2002, Toronto, Canada
- ⁶⁹ Hunziker E.B.: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Jun;10(6):432-63
- ⁷⁰ Schneider U.; Breusch SJ.; von der Mark K.: Current status of autologous chondrocyte transplantation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999 Sep-Oct;137(5):386-92
- ⁷¹ Dell'Accio F.; De Bari C.; Luyten FP: Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum* 2001 Jul;44(7):1608-19
- ⁷² Zaucke F.; Dinser R.; Paulsson M.: Cartilage oligomeric protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 2001, 358: 17-24.
- ⁷³ Benya P.D.; Schaffer J.D.: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215-224, 1982
- ⁷⁴ Gaissmaier C.; Fritz J.; Maurer F.; Aicher W.; Höntzsch D.; Weise K.: Inkomplette Redifferenzierung humaner artikulärer Knorpelzellen in Alginatebeads nach mehrfacher Passagierung in der Monolayerkultur. Fortschrittsberichte der 64. Jahrestagung der DGU, 10.-13. September 2000, Hannover
- ⁷⁵ Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK: Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jul;12(7):559-67.
- ⁷⁶ Giannoni P, Crovace A, Malpeli M, Maggi E, Arbico R, Cancedda R, Dozin B: Species variability in the differentiation potential of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):237-48.

-
- ⁷⁷ Weise K, Krackhardt T, Gaissmaier C: Die operative Behandlung von Gelenkknorpeldefekten unter besonderer Berücksichtigung der autologen Knorpelzelltransplantation: Grundlagen – Ergebnisse – Ausblick. *OP-Journal* 2000, 16: 150-159.
- ⁷⁸ Mullis K.B.; Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987
- ⁷⁹ von der Mark K.; Gauss V.; von der Mark H.; Muller P.: Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267: 531-532, 1977
- ⁸⁰ Lefebvre V.; Peeters-Joris C.; Vaes G.: Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the differentiation of articular chondrocytes by serial subculture. *Biochem Biophys Acta* 1051: 266-275, 1990
- ⁸¹ Kuettner K.; Memoli V.; Pauli B.; Wrobel N.; Thonar E.; Daniel J.: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 93: 751-757, 1982
- ⁸² Kostoulas G.; Lang A.; Trueb B.; Baici A.: Differential expression of mRNAs for endopeptidases in phenotypically modulated („dedifferentiated“) human articular chondrocytes. *FEBS Letters* 412: 453-455, 1997
- ⁸³ Guerne P.; Sublet A.; Lotz M.: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 158: 476-484, 1994
- ⁸⁴ Lee D.; Bentley G.; Archer C.: The control of cell division in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1: 137-146
- ⁸⁵ Rodemann H.P.; Binder A.; Burger A.; Guven N.; Loffler H.; Bamberg M.: The underlying cellular mechanics of fibrosis. *Kidney Int Suppl*, 49: 32-36, 1996
- ⁸⁶ Gaissmaier C.; Aicher W.K.; Ziegler B.; Wiech O.M.; Sell S.; Weise K.: Analysis of cytokine and matrix protease expression in stress-activated differentiating osteoblasts. *ORS, Orlando 2000, USA*
- ⁸⁷ van Susante J.L.C.; Buma P.; von Osch J.V.M.; Versleyen D.; van der Kraan; van der Berg W.B.; Homminga G.N.: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 66: 549-556, 1995
- ⁸⁸ Buschmann M.D.; Gluzband Y.A.; Grodzinsky A.J.; Kimura J.H.; Hunziker E.B.: Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 10: 745-758, 1992

⁸⁹ Hunziker E.B.: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 432-463

⁹⁰ Cancedda R.; Descalzi Cancedda F.; Castagnola P.: Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159: 265-358, 1995

⁹¹ Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N: Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer (2D) and three-dimensional (3D) alginate cultures. *Biomaterials* (in press).

⁹² Marlovits S, Hombauer M, Tamandl D, Vecsei V, Schlegel W: Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture. *Int J Mol Med* 2004; 13:281-287.

7. Danksagung

Für die Bereitstellung des Labors, der Gebrauchsgegenstände und der großzügigen fachlichen Unterstützung will ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Kuno Weise und Herrn Dr. med. Christoph Gaissmaier bedanken.

Herrn PD Dr. Wilhelm K. Aicher danke ich für den fachlichen Rat und für die Benützung des Labors.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die kontinuierliche und großzügige Unterstützung.

8. Lebenslauf

Personalien:

Name: Würz
Vornamen: Thomas Hartmann
Geburtsdatum: 01.10.1974
Geburtsort: Esslingen am Neckar
Nationalität: Deutschland, USA
Zivilstand: Verheiratet mit Marta Cortes-Cros, PhD
Eltern: Dr. med. Hartmann A. Würz
Martha J. Würz, geb. Schnerre
Geschwister: Petra J. Howard-Würz

Ausbildung:

06.2003 **Educational Commission for Foreign Medical Graduates**
Vollizensierung. Berechtigung zur klinischen Tätigkeit in den USA.

19.11.2002 **Universität Tübingen**, Medizinische Fakultät
3. Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums.

05.-09.2002 **Universität Tübingen**, Medizinische Fakultät Tertianal
im Praktischen Jahr in Chirurgie an der Städtischen Klinik Esslingen, Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen.

01.-05.2002 **Tufts University School of Medicine**
Tertianal im Praktischen Jahr in Innerer Medizin („sub-internship“) am New England Medical Center, Boston

10.2001-01.2002 **Harvard Medical School**
Wahlfach Tertianal im Praktischen Jahr in Orthopädischer Chirurgie am Massachusetts General Hospital und Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston

WS 1998/99-SS 2002	Universität Tübingen , Medizinische Fakultät Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums. 2. Staatsexamen im September 2001.
SS 1998	Universität Kiel , Medizinische Fakultät Erstes Semester Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums.
SS1996-WS 1997/98	Universität Giessen , Medizinische Fakultät Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums.
WS 1994/95- WS 1995/96	Universität Tübingen , Juristische Fakultät Abschluss des Grundstudiums.
06.1994	Georgii-Gymnasium , Esslingen Abitur.
06.-08.2003	Harvard University Business Case Study Program.
Beruflicher Werdegang:	
Seit 07.2003	Inselspital Bern , Universität Bern Assistenzarzt in der Orthopädischen Chirurgie bei Prof. Dr. R. Ganz und Prof. Dr. K.A. Siebenrock.
12.2002-06.2003	Massachusetts General Hospital , Harvard Medical School Research fellow im Bioengineering Labor bei Prof. Dr. Guoan Li. Erstellung einer Methode zur in vivo Analyse von Gelenkskinematik.
10.2000-05.2001	Massachusetts Institute of Technology Research fellow am Center for Biomedical Engineering bei Prof. Dr. Alan J. Grodzinsky. Erstellung und Implementierung einer Methodik zur Extraktion von boviner kartilaginärer mRNA zur Analyse der Auswirkungen von mechanischer Kompression und verschiedener Zellkulturbe- dingungen auf Chondrozyten und deren Genex- pression.
Seit 1999	Universität Tübingen , Medizinische Fakultät Doktorarbeit in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik. Doktorvater Prof. Dr.med. K. Weise, Betreuung durch Dr.med. Christoph Gaissmaier.
