

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie,  
Arbeitsbereich Orthopädie, Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekte von Polystyrol- und Polyetherimid-Zellkulturinserts mit  
verschiedenen Rauigkeitsstufen auf die Morphologie, die  
metabolische Aktivität und das Expressionsprofil artikulärer  
Chondrozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josephine Elisa Ulrike König

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.09.2020

# **Effekte von Polystyrol- und Polyetherimid-Zellkulturinserts mit verschiedenen Rauigkeitsstufen auf die Morphologie, die metabolische Aktivität und das Expressionsprofil artikulärer Chondrozyten**

Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	2
Abstract.....	3
Zusammenfassung.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Gelenkknorpel.....	6
1.1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Gelenkknorpels.....	7
1.1.2 Regenerationspotential des Gelenkknorpels.....	12
1.2 Knorpelschäden.....	13
1.3 Therapieansätze von Knorpelschäden.....	16
1.4 Chondrozyten in der Zellkultur.....	18
1.5 Zielstellung.....	20
2 Material.....	23
2.1 Inserts.....	23
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Versuchsmaterialien.....	25
2.3 Medien und Puffer.....	27
2.4 Primer.....	29
2.5 Kits.....	29
2.6 Geräte.....	30
2.7 Software.....	31
3 Methodik.....	32
3.1 Zellkultur.....	32
3.1.1 Chondrozytenisolierung.....	34
3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Chondrozyten.....	34
3.1.3 Expansion der Chondrozyten.....	35
3.1.4 Zellzählung.....	35

3.1.5	Aussaat der Chondrozyten in die Inserts .....	36
3.2	Nachweis der Morphologie und Adhärenz der Chondrozyten mittels lichtmikroskopischer Analyse .....	39
3.3	Kontrolle der metabolischen Aktivität der Chondrozyten mittels Alamar Blue Assay .....	39
3.4	Ermittlung der Vitalität der Chondrozyten durch Lebend-Tot- Färbung .....	41
3.5	Genexpressionsanalyse mittels RTD-PCR .....	43
3.5.1	RNA-Isolation .....	44
3.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	45
3.5.3	Reverse Transkription .....	46
3.5.4	Real Time Detection Polymerase Chain Reaction .....	47
3.6	Statistische Analysen .....	51
3.7	Richtlinien .....	52
4	Ergebnisse .....	53
4.1	Effekte von PS und PEI auf die Morphologie der Chondrozyten .....	53
4.2	Effekte von PS und PEI auf die metabolische Aktivität der Chondrozyten .....	55
4.3	Effekte von PS und PEI auf die Vitalität der Chondrozyten .....	57
4.4	Effekte von PS und PEI auf die Genexpression der Chondrozyten .....	58
5	Diskussion .....	62
6	Fazit .....	68
7	Abkürzungsverzeichnis .....	70
8	Literaturverzeichnis .....	71
	Eidesstattliche Erklärung .....	79
	Anteilsklärung an erfolgten Publikationen .....	80
	Lebenslauf .....	81
	Publikationsliste .....	83
	Danksagung .....	84

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Arthroskopisches Bild eines gesunden Kniegelenks.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Histologisches Bild eines hyalinen Knorpels.....	8
<b>Abbildung 3:</b> Elektronenmikroskopisches Bild eines typischen Gelenkchondrozyten.....	9
<b>Abbildung 4:</b> Extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels.....	10
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Zoneneinteilung des Gelenkknorpels.....	12
<b>Abbildung 6:</b> Verschiedene Knorpelqualitäten in der Knorpelregeneration.....	13
<b>Abbildung 7:</b> Arthroskopisches Bild eines arthrotisch veränderten Kniegelenkes.....	14
<b>Abbildung 8:</b> Röntgenbilder eines arthrotisch veränderten Kniegelenkes.....	15
<b>Abbildung 9:</b> Lebenszeitprävalenz der Arthrose 2010 in Deutschland.....	15
<b>Abbildung 10:</b> Schematischer Ablauf einer Knorpelzelltransplantation.....	18
<b>Abbildung 11:</b> Humane Gelenkchondrozyten in einer Monolayer-Kultur nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden und 5 Tagen.....	20
<b>Abbildung 12:</b> Maßgefertigte PS- und PEI-Inserts.....	24
<b>Abbildung 13:</b> Chemische Strukturen von Polystyrol und Polyetherimid.....	25
<b>Abbildung 14:</b> Zellkulturschema der 24-Well-Platten.....	37
<b>Abbildung 15:</b> Schemata der 96-Well-Platten für den Alamar Blue-Test.....	38
<b>Abbildung 16:</b> Reduktion von Resazurin zu Resorufin.....	40
<b>Abbildung 17:</b> Fotos einer 96-Well-Platte für den Alamar Blue-Test.....	40
<b>Abbildung 18:</b> Enzymatische Spaltung des nicht fluoreszierenden Farbstoffes Fluoresceindiacetat zum grün fluoreszierenden Fluorescein.....	41
<b>Abbildung 19:</b> Zellkulturinsert mit abnehmbarem Boden für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.....	42
<b>Abbildung 20:</b> Schema der 24-Well-Platten für die Lebend-Tot-Färbung.....	43
<b>Abbildung 21:</b> Beispiel eines RNA-Absorptionsspektrums.....	46
<b>Abbildung 22:</b> Schemata der 96-Well-PCR-Platten für die RTD-PCR.....	49
<b>Abbildung 23:</b> Lichtmikroskopische Fotodokumentation der Chondrozyten.....	54
<b>Abbildung 24:</b> Clustergößen.....	54
<b>Abbildung 25:</b> Farbwechsel der Alamar Blue-Lösung.....	56
<b>Abbildung 26:</b> Metabolische Aktivität der Chondrozyten.....	56
<b>Abbildung 27:</b> Lebend-Tot-Färbung der Chondrozyten.....	57
<b>Abbildung 28:</b> Relative Aggrekan-Genexpression.....	59
<b>Abbildung 29:</b> Kollagen Typ I-Genexpression.....	60
<b>Abbildung 30:</b> Kollagen Typ II-Genexpression.....	61

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Vergleich der Knorpelarten.....	6
<b>Tabelle 2:</b> Rauigkeitsstufen der Polystyrol- und Polyetherimid-Zellkulturinserts.....	24
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	26
<b>Tabelle 4:</b> Verwendetes Versuchsmaterials.....	27
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Medien in der Zellkultur.....	28
<b>Tabelle 6:</b> Weitere verwendete Medien und Puffer.....	28
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Primer.....	29
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Kits.....	30
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Geräte.....	30
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Software.....	31
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Spender.....	33
<b>Tabelle 12:</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes der Firmen ABI und Qiagen.....	48
<b>Tabelle 13:</b> PCR-Protokoll für Primer der Firma ABI.....	50
<b>Tabelle 14:</b> PCR-Protokoll für Primer der Firma Qiagen.....	50
<b>Tabelle 15:</b> Primereffizienzen.....	51

## Abstract

*In vitro* cultured autologous chondrocytes can be used for implantation to support cartilage repair. For this purpose, a very small number of autologous cells harvested from a biopsy have to be expanded in monolayer culture. Commercially available polymer surfaces lead to chondrocyte dedifferentiation. Hence, the demanding need for optimized polymers and surface topologies supporting chondrocytes' differentiated phenotype *in vitro* arises.

In this study the effect of tailored cell culture plate inserts prepared from polystyrene (PS) and polyether imide (PEI) exhibiting three different roughness levels (R0, RI, RII) on chondrocyte morphology, metabolism and gene expression profile was explored. As a control, commercially available tissue culture plastic (TCP) dishes were included. Primary porcine articular chondrocytes were seeded on tailored PS and PEI inserts with three different roughness levels. The chondrocyte morphology was analyzed by light microscopically examination after 24 and 48 hours. The metabolic activity of the chondrocytes was determined for 24 hours using alamar blue assay. Chondrocyte gene expression profiles (aggrecan, type I and type II collagen) were monitored after 48 hours using Real Time Detection (RTD)-PCR.

Chondrocytes cultured on PS and PEI surfaces formed cell clusters after 24 and 48 hours, which was not observed on TCP. The lack of polymer surface functionalisation might lead to chondrocyte cluster formation. The metabolic activity of chondrocytes cultured on PS was in mean lower than of chondrocytes cultured on PEI, but significantly lower than on TCP. Gene expression analyses revealed a significantly elevated expression of cartilage-specific aggrecan and a significantly impaired expression of both collagen types by chondrocytes on smooth PS and PEI surfaces compared with TCP.

In summary, PEI is a biocompatible biomaterial suitable for chondrocyte culturing, which can be further chemically functionalized in future for generating specific surface interactions or covalent binding of stimulatory biomolecules.

## Zusammenfassung

Autologe Chondrozyten können *in vitro* kultiviert werden und zur Defektdeckung von Knorpelschäden implantiert werden. Dafür muss eine kleine Menge an autologen Knorpelzellen während einer Biopsie aus dem Gelenk entnommen werden und in einer Monolayerkultur expandiert werden. Kommerziell erhältliche Zellkulturplatten rufen dabei eine Dedifferenzierung der Chondrozyten hervor. Aus diesem Grund steigt die Nachfrage nach optimierten Kunststoffen und Oberflächenbeschaffenheiten, die die Proliferation differenzierter Chondrozyten induzieren könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von maßangefertigten Inserts für Multiwell-Platten aus Polystyrol (PS) und Polyetherimid (PEI) mit drei verschiedenen rauen Oberflächen (R0, RI, RII) auf die Morphologie, die metabolische Aktivität und das Genexpressionsprofil artikulärer Chondrozyten untersucht. Als Kontrolle dienten kommerziell erhältliche Zellkulturplatten. In die Inserts aus PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen wurden primäre artikuläre Chondrozyten von Hausschweinen ausgesät. Die Zellmorphologie wurde nach 48 Stunden lichtmikroskopisch untersucht. Die metabolische Aktivität der Chondrozyten wurde über eine Zeitspanne von 24 Stunden durch Anwendung des Alamar Blue-Tests bestimmt. Das Genexpressionsprofil der Chondrozyten (Aggrecan, Kollagen Typ I und Kollagen Typ II) wurde mithilfe der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real Time Detection [RTD]-PCR) analysiert.

Die Chondrozyten, die auf den Zellkulturoberflächen aus PS und PEI kultiviert wurden, bildeten, im Gegensatz zu den Zellen auf der Kontrolloberfläche, nach 24 und 48 Stunden Zellcluster. Diese Beobachtung könnte auf die fehlende Funktionalisierung der zu testenden Inserts zurückgeführt werden, durch die die Anheftung von Zellen erschwert wird. Die metabolische Aktivität der Chondrozyten, die auf PS kultiviert wurden, war im Mittel niedriger als die Aktivität derjenigen, die auf PEI kultiviert wurden. In beiden Fällen war die metabolische Aktivität der Chondrozyten jedoch signifikant geringer als bei Anzucht der Chondrozyten auf kommerziell erhältlichen Zellkulturoberflächen. Im Vergleich zur Kontrolle war die Genexpression des knorpelspezifischen Aggrecans der auf glattem PS und PEI kultivierten Chondrozyten signifikant höher als die derjenigen, die auf der Kontrolloberfläche kultiviert wurden. Die Genexpression beider Kollagen-Typen war dagegen bei beiden Materialien auf glatter und rauer Oberfläche verglichen mit der Kontrolle signifikant geringer.

Insgesamt scheint PEI ein biokompatibles Material für die Zellkultur von Chondrozyten zu sein. Eine zusätzliche chemische Funktionalisierung könnte zukünftig spezifische Oberflächen-Interaktionen oder kovalente Bindungen von stimulatorischen Biomolekülen ermöglichen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Gelenkknorpel

Knorpel zählt zu den Binde- und Stützgeweben. Im adulten menschlichen Organismus findet man drei verschiedene Arten von Knorpel: elastischen Knorpel, Faserknorpel und hyalinen Knorpel (Tabelle 1). Die drei Knorpelarten unterscheiden sich unter anderem durch die Menge und Art der Fasern, die Anzahl und Anordnung der Knorpelzellen (Chondrozyten) und die dadurch resultierenden physikalischen Eigenschaften <sup>[1, 2]</sup>. Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel, der im menschlichen Körper am häufigsten vorkommenden Knorpelart.

**Tabelle 1:** Vergleich der Knorpelarten <sup>[2]</sup>

	Elastischer Knorpel	Faserknorpel	Hyaliner Knorpel
Anordnung der Chondrozyten	Einzelnen oder in kleinen Gruppen	In kleinen Gruppen	Einzelnen oder in kleinen isogenen Gruppen (bis zu 10 Zellen)
Art der Fasern	Elastische Fasern, Kollagen Typ II	Überwiegend Kollagen Typ I	Überwiegend Kollagen Typ II
Eigenschaften	Elastisch	Wenig elastisch, hohe Reißfestigkeit	Druckelastisch
Beispiele des Vorkommens	Ohrmuschel, Epiglottis	Disci intervertebrales, Menisci, Symphyse	Gelenkknorpel, Nasenseptumknorpel, Rippenknorpel, Tracheal- und Kehlkopfknorpel

Der hyaline Knorpelüberzug artikulierender Knochen sorgt durch die Lastverteilung der mechanisch einwirkenden Kräfte und die Bildung einer reibungsarmen Gleitfläche für eine physiologische Gelenkfunktion und somit für eine schmerzfreie Bewegung. Aufgrund der hohen Druckelastizität kehrt hyaliner Knorpel nach Reduktion des Drucks in seine ursprüngliche Form zurück [1, 2, 3]. Es gibt bis heute keinen industriell hergestellten Werkstoff, der die Materialeigenschaften des Knorpels bezüglich der Kombination von Festigkeit, Elastizität und Reibungskoeffizient vergleichbar imitieren kann [5].

### 1.1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Gelenkknorpels

Der gesunde hyaline Gelenkknorpel ist makroskopisch ein glattes, glänzendes weißlich-gelblich durchscheinendes Gewebe (griechisch "hyalos" – Glas) (siehe Abbildung 1) [4]. Gelenkknorpel ist weder innerviert noch ist er durch Gefäße an die Blutversorgung und das lymphatische System angeschlossen. Die Versorgung der Knorpelzellen erfolgt daher vor allem durch Diffusion [2, 5, 6, 7]. Dabei unterstützt die zyklische Kompression des Knorpelgewebes bei der Gelenkbewegung die Diffusion durch eine Art Pumpmechanismus, durch den auch der Fluss von Stoffwechselprodukten und Stoffwechselmetaboliten beschleunigt wird [3, 10]. Das Knorpelgewebe erreicht in größeren Gelenken, wie beispielsweise dem Kniegelenk, eine Dicke von etwa 0,5 – 4 mm [10].



**Abbildung 1:** Arthroskopisches Bild eines gesunden Kniegelenks. Femoropatellares Gleitlager (<http://orthoprax.ch>; 01.08.2015)

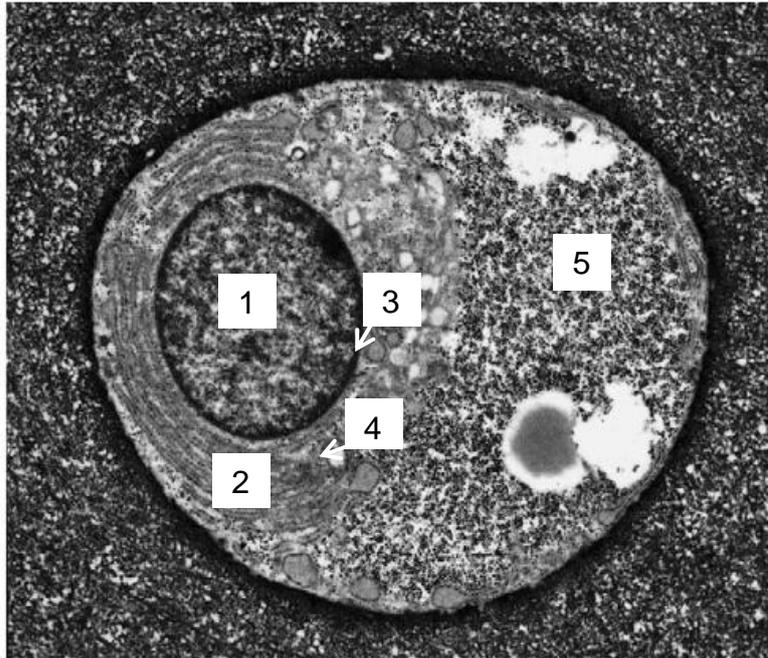
Der einzige Zelltyp des hyalinen Knorpels ist der Chondrozyt. Chondrozyten entwickeln sich aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen und machen weniger als 5 % des gesamten Knorpelvolumens aus, während 95 % des Knorpelvolumens aus

extrazellulären Matrixbestandteilen bestehen (Abbildung 2) [5, 7]. Chondrozyten haben einen primär anaeroben Stoffwechsel und weisen nach Abschluss des Wachstums keine mitotische Aktivität mehr auf [7]. Die Deckung des Energiebedarfs erfolgt zum größten Teil über Glykolyse [8]. *In vivo* sind die Chondrozyten des hyalinen Knorpels durch die sie umgebende Knorpelmatrix voneinander isoliert. Es besteht also kein direkter Zell-Zell-Kontakt [9]. Phänotypisch präsentiert sich der hyaline Gelenk-Chondrozyt als runde oder polygonale Zelle, mit Ausnahme der Chondrozyten an der Knorpeloberfläche, die eine abgeflachte bis scheibenförmige Gestalt annehmen können (Abbildung 2) [8, 10].



**Abbildung 2:** Histologisches Bild eines hyalinen Knorpels (AG Schulze-Tanzil). In der Hämatoxylin-Eosin Färbung erscheint der hyaline Knorpel als milchig-bläuliches Gewebe. Es sind bis zum Knochen vereinzelt und in isogenen Gruppen liegende Chondrozyten erkennbar. Die Chondrozyten sind von einer basophilen Matrix, dem Knorpelhof, umgeben. Der Knorpelhof besteht vor allem aus Proteoglykanen. Der Chondrozyt bildet zusammen mit seinem Knorpelhof und seiner Knorpelzellohne (Lakune) ein Chondron. Zwischen den Chondronen liegt das Interterritorium mit heller Knorpelmatrix. Die Kollagenfasern sind lichtmikroskopisch nicht erkennbar, da sie von anderen Matrixbestandteilen bedeckt sind. Man spricht daher auch von „maskierten“ Kollagenfasern.

Intrazellulär zeigt der Chondrozyt typische Bestandteile einer metabolisch aktiven Zelle, die ein hohes Matrixvolumen produzieren muss: ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum, einen großen Golgi-Apparat, Mitochondrien, Glykogen und Lipidtropfen (Abbildung 3) [8, 11].

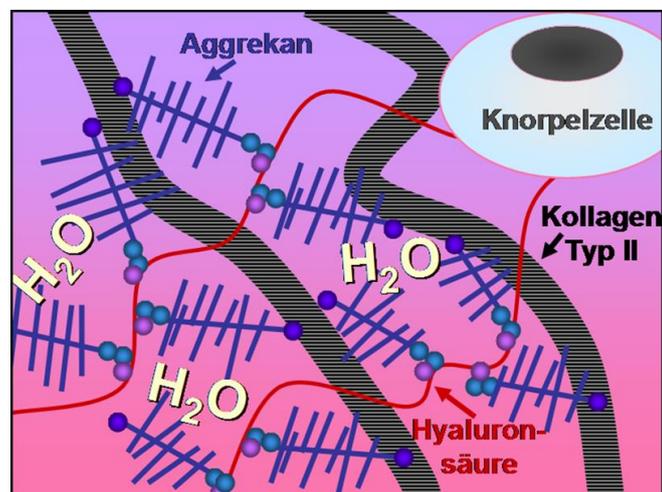


**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopisches Bild eines typischen Gelenk-Chondrozyten [8]. Der Chondrozyt zeigt seine phänotypische runde bis ovale Form. 1 - Zellkern; 2 – raues endoplasmatisches Retikulum; 3 – Mitochondrium; 4 – Lipidtropfen; 5 – Glykogengranula

Chondrozyten sind für die Synthese und den Katabolismus der extrazellulären Matrixbestandteile zuständig. Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Gelenkknorpels besteht hauptsächlich aus Wasser, Kollagen Typ II und Proteoglykanen und ist für die mechanischen und funktionellen Eigenschaften des Knorpelgewebes verantwortlich [1, 2, 6, 7, 10, 11].

Kollagen Typ II macht 90-95 % der Kollagene im hyalinen Knorpel aus und ist Hauptbestandteil der Kollagenfibrillen. Die Kollagenfibrillen bilden eine Gitterkonstruktion, durch die das Knorpelgewebe seine Form und Festigkeit erhält. Weitere Kollagene, die unter anderem für die Quervernetzung der Kollagenfibrillen verantwortlich sind, sind die Kollagene vom Typ V, VI, IX, X und XI [5, 10, 12]. Im engen Kontakt mit der kollagenen Gitterkonstruktion stehen die Proteoglykane. Diese liegen zwischen den Kollagenfibrillen verteilt und setzen sich aus einem zentralen Protein und aus daran gebundenen sulfatierten Polysaccharidketten (Glykosaminoglykanen) zusammen (Abbildung 4). Die Form der Proteoglykane ist mit Flaschenbürsten vergleichbar. Durch ein „link protein“ binden die Proteoglykane an Hyaluronsäure. Hyaluronsäure ist ein langes, verzweigtes Glykosaminoglykan, das aus nicht-sulfatierten

Disaccharideinheiten aufgebaut ist. Durch die negative Ladung der Polysaccharidketten zieht das Aggregat aus Proteoglykanen, Hyaluronsäure und anderen Glykosaminoglykanen Wassermoleküle an und wird somit hydratisiert [2, 3, 5, 10, 11]. Im hyalinen Knorpel kommt vor allem das große Proteoglykan Aggrekan vor. Die Aggrekanmoleküle machen 90 % der gesamten extrazellulären Knorpelmatrix aus und füllen beinahe den gesamten Raum zwischen den Kollagenfibrillen aus [5]. Die Wasserbindungsfähigkeit des Aggrekans führt zu der hohen Druck-Elastizität des hyalinen Knorpels. Wirkt Druck auf das Gewebe ein, werden die Wassermoleküle teilweise aus ihrer Bindung mit den Polysaccharidketten verdrängt. Die negativen Ladungen kommen sich bei weiterem Druck näher und stoßen sich gegenseitig ab. Einer weiteren Kompression wird dadurch entgegengewirkt. Mit Nachlassen des Drucks wird das Wasser erneut von den negativen Ladungen angezogen [2]. Aufgrund der räumlichen Limitation durch das Kollagennetzwerk sind nur 40 – 60 % der Proteoglykane hydratisiert. Durch die somit dauerhaft vorhandenen Abstoßungskräfte der freien negativ geladenen Enden der Polysaccharidketten kommt es zu einem Quellungsdruck, der dafür verantwortlich ist, auf den Knorpel einwirkende Druckkräfte abzufedern [3, 10]. Wird das Kollagennetzwerk beschädigt, führt die ungehinderte Hydratation der Proteoglykane zu einem Anschwellen und Aufweichen des Knorpelgewebes [10].

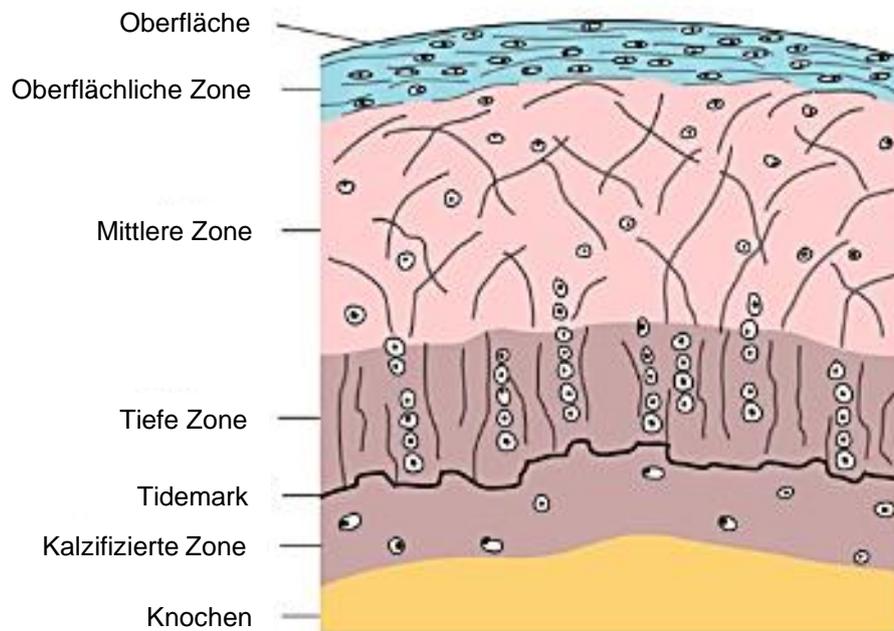


**Abbildung 4:** Extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels (AG Schulze-Tanzil)

Da Kollagen Typ II und Aggrekan spezifische Bestandteile der extrazellulären Matrix hyalinen Knorpels sind, gelten diese beiden Makromoleküle als Marker für die phänotypische Stabilität von hyalinen Gelenkchondrozyten [9].

Artikulärer Gelenkknorpel lässt sich morphologisch in vier Zonen aufteilen, die kontinuierlich ineinander übergehen: die oberflächliche oder tangential Zone, die mittlere Zone, die tiefe Zone und die kalzifizierte Zone [13]. Die verschiedenen Zonen unterscheiden sich unter anderem durch ihre Dicke, die Anordnung der Chondrozyten und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Abbildung 5). In der oberflächlichen Zone ist die Zelldichte relativ hoch. Die Chondrozyten sind abgeflacht bis spindelförmig und kleiner als in den darunterliegenden Schichten. Sie sind, ebenso wie die Kollagenfasern, parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die Organisation der oberflächlichen Zone spiegelt somit ihre funktionale Rolle wieder. Sie ist zwar komprimierbar, besitzt aber kaum stoßdämpfende Wirkung, sondern leitet vor allem horizontal einwirkende Scherkräfte auf die unteren Schichten weiter [10]. Die Chondrozyten der oberflächlichen Zone verhalten sich deutlich steifer und visköser als die Chondrozyten der tieferen Zonen [5, 13, 14, 15]. Oberflächlich gelegene Chondrozyten sezernieren zudem das Glykoprotein Lubricin, das ein wichtiger Bestandteil der Synovialflüssigkeit ist, die die Reibung im Gelenk reduziert [10]. Dagegen sind die Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen (beispielsweise Kollagen Typ II oder Aggrecan) und die Proliferationsrate herabgesetzt. Die oberflächliche Zone macht etwa 10-20 % der Knorpeldicke aus [13]. In der mittleren Zone des hyalinen Knorpels finden sich im Vergleich zu den anderen Zonen des Gelenkknorpels die Kollagenfibrillen mit dem größten Durchmesser. Zudem ist hier die Konzentration an Proteoglykanen, wie zum Beispiel Aggrecan, am höchsten und die Konzentration an Wasser am niedrigsten. Die Chondrozyten entsprechen ihrem Phänotyp und sind somit oval bis rundlich. Sie sind in Säulen senkrecht zur Gelenkoberfläche angeordnet. Die Zelldichte ist geringer als in der oberflächlichen Zone. Die Chondrozyten zeigen einen hohen Umsatz an extrazellulären Matrixbestandteilen. Die Kollagenfasern verlaufen ohne erkennbare Richtung, auch wenn die Fasern teilweise der Ausrichtung der einwirkenden mechanischen Kräfte folgen [10]. Die mittlere Zone bildet etwa 10-40 % der Knorpeldicke [5, 13, 14] und federt als eine Art mechanisches Kissen die einwirkenden Kräfte ab [10]. Auch in der tiefen Zone des Gelenkknorpels sind die Chondrozyten oval bis rund und in senkrechten Säulen zur Knorpeloberfläche angeordnet. Die Kollagenfasern verlaufen ebenfalls senkrecht und reichen bis in die „tidemark“, der Grenze zwischen nicht-kalzifizierter und kalzifizierter Matrix. Die tiefe Schicht zeichnet sich vor allem durch eine hohe Festigkeit aus. Sie macht über 40 % der Knorpeldicke aus [5, 10, 13, 14, 15]. Die kalzifizierte Zone trennt den hyalinen Knorpel von dem darunterliegenden subchondralen Knorpel [5]. Das Gewebe ist sehr fest

und weist die geringste Zelldichte aller Knorpelzonen auf. Die Chondrozyten sind rund und metabolisch kaum aktiv. Die Kollagenfasern verlaufen senkrecht. Sie sind mit den Kollagenfasern des Knochens verbunden und stellen somit eine biomechanische Verbindung von Knorpel und Knochen her <sup>[10]</sup>.



**Abbildung 5:** Schematische Zoneneinteilung des Gelenkknorpels <sup>[13]</sup>

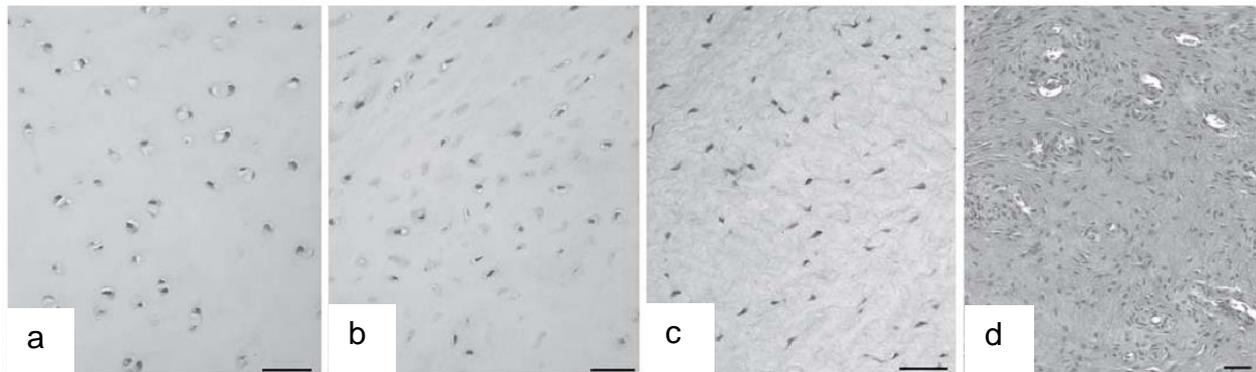
Bereits kleine Veränderungen der zonalen Struktur können die Funktionalität des Gelenkknorpels beeinflussen und zu einer progressiven Degeneration der Gelenkoberfläche führen <sup>[7]</sup>.

### 1.1.2 Regenerationspotential des Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel zählt zu den bradytrophen Geweben. Der Matrixumsatz der Chondrozyten ist sehr langsam. Die Halbwertszeit von Kollagen wird beispielsweise auf mehrere Jahrzehnte geschätzt <sup>[10]</sup>. Nach dem Schluss der Epiphysenfugen können zudem keine multipotenten Stammzellen mehr in das Knorpelgewebe und in den Knorpeldefekt wandern. Das Regenerationspotential des Gelenkknorpels ist somit sehr gering <sup>[10, 16]</sup>.

Durchdringt ein Knorpeldefekt nicht den subchondralen Knochen, so heilt er nicht ab. Reicht der Defekt allerdings bis in den Markraum des Knochens, gelangen

mesenchymale Stammzellen in den Defekt. Es entsteht Faserknorpel, der den Defekt ausfüllt (Abbildung 6) <sup>[17]</sup>. Das faserknorpelige Narbengewebe kann auf Dauer den in den Gelenken auftretenden Drücken jedoch nicht standhalten und degeneriert <sup>[15, 17, 20, 21]</sup>.



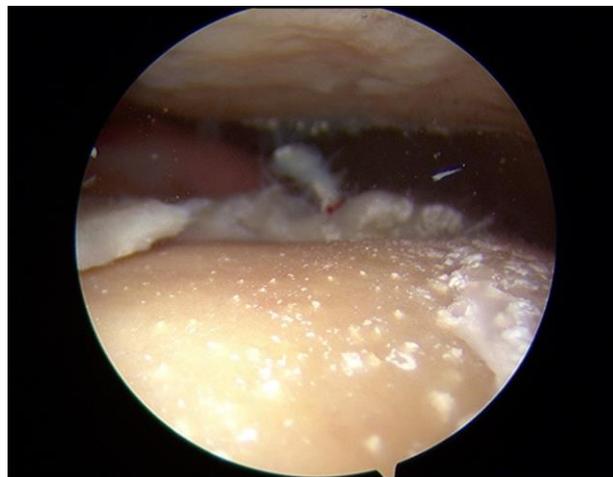
**Abbildung 6:** Verschiedene Knorpelqualitäten in der Knorpelregeneration. a - Hyaliner Knorpel mit Chondrozyten in phänotypischer runder bis ovaler Form, b – Hyaliner und Faserknorpel mit einer Mischung von ovalen und spindelförmigen Chondrozyten, c – Faserknorpel mit spindelförmigen Chondrozyten und sichtbaren Kollagenfaserbündeln, d – Faserknorpeliges Narbengewebe; Messbalken: 50µm <sup>[21]</sup>

## 1.2 Knorpelschäden

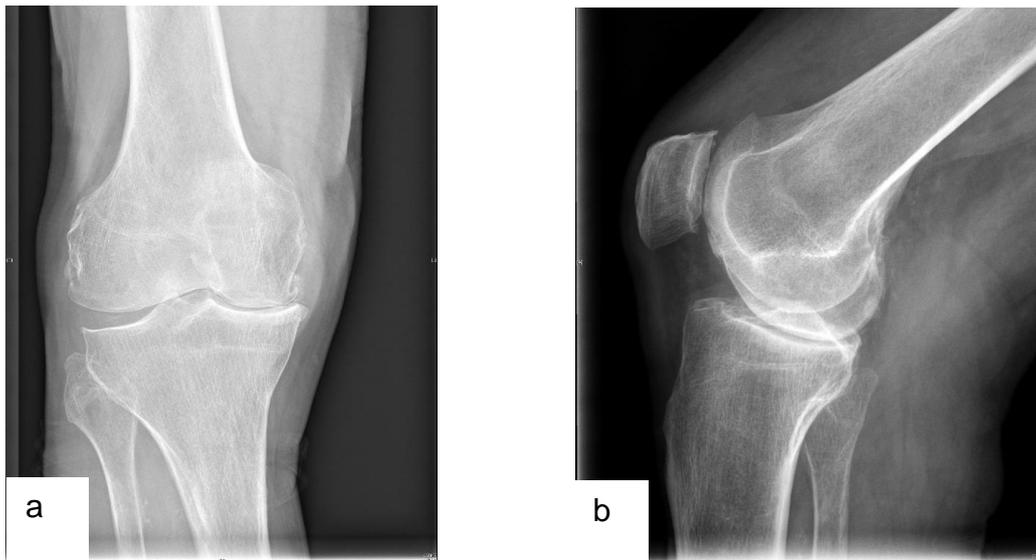
Degenerative und traumatische Gelenkschäden sind wegen ihrer Häufigkeit, der damit einhergehenden Einschränkung der Gelenkfunktionalität und des Auftretens von Schmerzen eine bedeutsame Erkrankung <sup>[18]</sup>. Arthrose ist die weltweit am häufigsten vorkommende Gelenkerkrankung <sup>[19]</sup>. Sie ist charakterisiert durch die degenerative Zerstörung des betroffenen Gelenkknorpels und der an das Gelenk angrenzenden Knochen, Gelenkkapseln, Muskeln und Bänder <sup>[10, 19]</sup>. Besonders an den großen Gelenken der unteren Extremität, wie dem Knie- und dem Hüftgelenk, wird der Gelenkknorpel sehr hohen Druckbelastungen ausgesetzt, die Druckspitzen von bis zu 400 kg/cm<sup>2</sup> erreichen <sup>[5]</sup>. Kommt es in diesen Gelenken zu Mikrotraumen oder größeren Defekten, die nicht oder nur durch minderwertiges faserknorpeliges Narbengewebe repariert werden können, führt das häufig zu arthrotischen Veränderungen der Gelenkoberfläche. Klinisch kann es zu den typischen Symptomen Schmerz und Gelenkerguss sowie Gangproblemen kommen <sup>[10]</sup>.

Prinzipiell lassen sich zwei Formen der Arthrose unterscheiden: die primäre, idiopathische Form und die sekundäre Form, der eine bekannte Grunderkrankung zugrunde liegt. Ursachen der sekundären Form können unter anderem Fehlbelastungen

durch Achsfehlstellungen, Übergewicht, rheumatische Erkrankungen und traumatische Schädigung sein [15, 20]. Aufgrund der anfänglichen Beschwerdefreiheit kommt es oftmals erst spät zu einer Diagnosestellung, sodass bereits irreversible Veränderungen des Gelenkknorpels vorliegen. Im Endstadium der Arthrose kommt es zum vollständigen fokalen Verlust des hyalinen Knorpels, sodass der subchondrale Knochen sichtbar wird (Abbildung 7). Dieser Zustand wird auch als „Knorpelglatze“ bezeichnet. Durch den Verlust des druckelastischen Knorpelüberzugs kommt es zu einer deutlichen Verschmälerung des Gelenkspaltes (Abbildung 8). Unter den Druckbelastungen auf den Knochen kann es zu Knochendeformitäten bis hin zur Versteifung des Gelenkes kommen [15]. Dies kann über die Einschränkung der Beweglichkeit zu Behinderungen im alltäglichen Leben und zum Verlust an Lebensqualität führen.

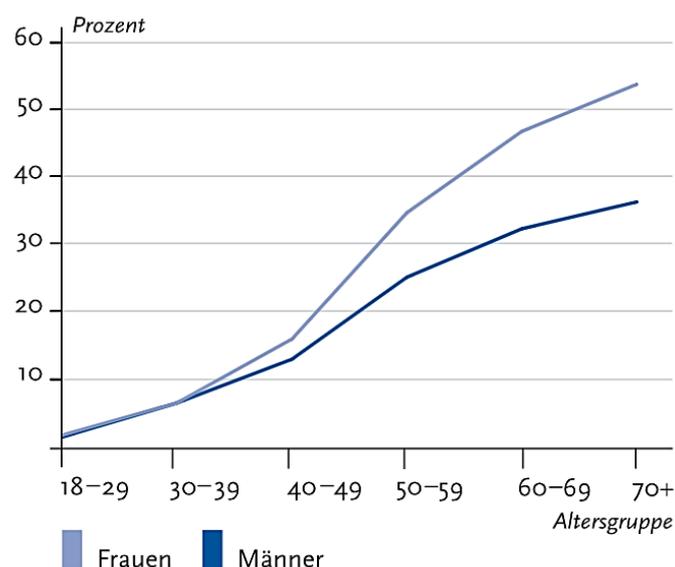


**Abbildung 7:** Arthroskopisches Bild eines arthrotisch veränderten Kniegelenkes (Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin). Auf der unteren Bildhälfte ist der subchondrale Knochen durch den Verlust des druckelastischen Knorpelgewebes als „Knorpelglatze“ sichtbar. Der umgebende Knorpel ist aufgefasert. Dieser Zustand entspricht einer fortgeschrittenen Gelenkdestruktion.



**Abbildung 8:** Röntgenbilder eines arthrotisch veränderten Kniegelenkes. Sichtbar ist eine deutliche Verschmälerung des Gelenkspaltes in anterior-posteriorem Strahlengang (a) und lateralem Strahlengang (b) (Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin).

Sozioökonomisch verursacht die Arthrose primär durch ihre Behandlungskosten als auch sekundär durch Arbeitsausfälle und Frühberentungen hohe Kosten [20]. Die Lebenszeitprävalenz der Arthrose steigt mit dem Lebensalter an. In einer Untersuchung des Robert-Koch-Institutes im Jahr 2010 betrug die Lebenszeitprävalenz bei Frauen über dem 60. Lebensjahr etwa 50 % und bei Männern über dem 60. Lebensjahr etwa 30 % (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Lebenszeitprävalenz der Arthrose 2010 in Deutschland [20]

Mit dem zunehmenden Anstieg des durchschnittlichen Lebensalters wird es in Zukunft hypothetisch auch zu einem Anstieg der Arthroseerkrankungen kommen.

### 1.3 Therapieansätze von Knorpelschäden

Ziele der Therapie von Gelenknorpelschäden sind die Schmerzreduktion, die Verbesserung der Funktionalität des betroffenen Gelenkes und die Verlangsamung oder Verhinderung einer Arthroseprogression [18, 23]. Im Spätstadium der Arthrose bleibt oftmals nur noch der Gelenkersatz durch eine Endoprothese. Für ältere Patienten stellt die Endoprothetik oftmals eine gute Therapieoption dar. Sie führt zu einer schnellen Schmerzreduktion und Verbesserung der Gelenkfunktion. Da die Implantate aber eine beschränkte Lebensdauer haben und jeder Wechsel eines Implantates zu einem erhöhten perioperativen Risiko führt, ist die Endoprothetik für jüngere Patienten keine zufriedenstellende Therapieoption [3].

Gängige Verfahren, die darauf abzielen die Knorpelregeneration anzuregen, sind das Débridement, die Mikrofrakturierung und die autologe oder allogene osteochondrale Transplantation [23]. Bei der Mikrofrakturierung wird der subchondrale Knochen angebohrt, wodurch es zu einer Einwanderung von multipotenten Stammzellen kommt. Es bildet sich faserknorpeliges Narbengewebe, dessen biomechanische Belastbarkeit auf Dauer schwer vorhersehbar ist. Meist korreliert das Ergebnis mit der Größe und dem Stadium des Knorpeldefektes [3,18]. Je größer der Defekt, desto größer ist das mit Faserknorpel aufgefüllte Areal und desto größer ist die Gefahr, dass der Ersatzknorpel den Belastungen des Gelenkes nicht standhalten kann und degeneriert. Bei der osteochondralen Transplantation von Knochen-Knorpel-Zylindern wird der Defekt zwar mit hyalinem Knorpel ersetzt, Nachteile sind aber insbesondere die Schwierigkeit die Transplantate zu fixieren und somit eine kontinuierliche Gelenkoberfläche herzustellen, die Gelenkwölbungen nachzubilden und die limitierte Verfügbarkeit der Transplantate. Zudem ist mit der Transplantation ein erhöhtes Infektrisiko und ein gehäuftes Auftreten von Entnahmestellenmorbidity verbunden [7, 24].

Eine Alternative zu den genannten Therapieoptionen ist die autologe Knorpelzelltransplantation, die das Ziel hat, eine Regeneration des Knorpelgewebes durch die Transplantation von Zellen, die ein chondrogenes Potential besitzen, zu

erreichen <sup>[25]</sup>. Bis heute können größere Knorpelschäden nur durch die autologe Knorpelzelltransplantation mit hyalinartigem Knorpelgewebe gedeckt werden <sup>[16]</sup>.

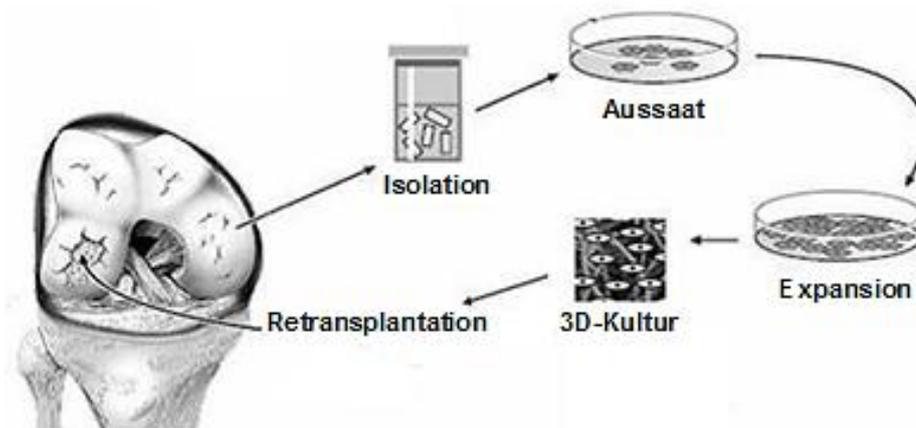
Sowohl experimentell als auch in der klinischen Anwendung zeigte die autologe Knorpelzelltransplantation eine Verbesserung der Heilung von Gelenkknorpeldefekten. 2003 untersuchten Peterson et al. 58 Patienten mit Osteochondrosis dissecans, die eine autologe Knorpelzelltransplantation erhalten hatten. Bei 93 % der Patienten trat eine verbesserte Heilung des hyalinen Gelenkknorpels auf. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Defektgröße und dem Therapieergebnis festgestellt werden <sup>[26, 27, 28, 29]</sup>.

Die Indikationen und Voraussetzungen für eine autologe Knorpelzelltransplantation wurden in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) und der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädischer Chirurgie (DGOOC) definiert und sind aktuell unter anderem gegeben bei

- Knorpelschäden Grad 3 und 4 nach ICRS mit einer Defektgröße von 3-10 cm<sup>2</sup>,
- tragfähigem Umgebungsknorpel,
- intakter korrespondierender Gelenkfläche (Schädigung bis maximal Grad 2 nach ICRS),
- intaktem Meniskus (Teilresektion bis maximal ein Drittel des Gesamtvolumens),
- maximal zwei unabhängigen Defekten, die aber nicht miteinander korrespondieren dürfen,
- physiologischer oder korrigierter Beinachse,
- suffizienter Bandführung,
- freier Gelenkbeweglichkeit,
- Lebensalter bis 50 Jahre <sup>[29]</sup>.

Die Indikation für die Durchführung einer Knorpelzelltransplantation wird in einer arthroskopischen Voruntersuchung überprüft. Liegen die genannten Voraussetzungen vor, werden aus einem unbelastetem Teil des Gelenks ein bis zwei Knorpel-Stanzzyylinder entnommen und unter sterilen Bedingungen in speziellen Transportgefäßen zu einem Zelllabor transportiert. Dort werden die Chondrozyten enzymatisch aus der sie umgebenden Knorpelmatrix isoliert und in einer Zellkulturflasche kultiviert. Die Chondrozyten vermehren sich in der Zellkulturflasche in einem sogenannten Monolayer, also in einer zweidimensionalen Umgebung. Im Anschluss werden die Zellen in eine

dreidimensionale Kulturumgebung überführt. Um einen Knorpelschaden, der 1 cm<sup>2</sup> groß ist, decken zu können, sind etwa eine Million Chondrozyten erforderlich <sup>[31]</sup>. Ist die für die Deckung des Knorpelschadens benötigte Zellzahl erreicht, werden die Zellen einigen Qualitätskontrollen unterzogen. Neben Infektionskontrollen werden die Zellen unter anderem hinsichtlich ihres morphologischen Phänotyps, ihrer Transkription knorpelspezifischer Matrixproteine (Kollagen Typ II, Aggrekan), ihrer Vitalität und ihrer absoluten Zellzahl im Transplantat überprüft <sup>[16, 31]</sup>. Sind die Qualitätsanforderungen erfüllt, werden die Zellen zur Transplantation freigegeben. Die Transplantation der Zellen erfolgt in einem zweiten operativen Schritt. Die implantierten Chondrozyten produzieren Knorpelmatrix, die den Knorpeldefekt nach und nach auffüllt. Der schematische Ablauf einer Knorpelzelltransplantation ist in der Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Schematischer Ablauf einer Knorpelzelltransplantation <sup>[32]</sup>

#### 1.4 Chondrozyten in der Zellkultur

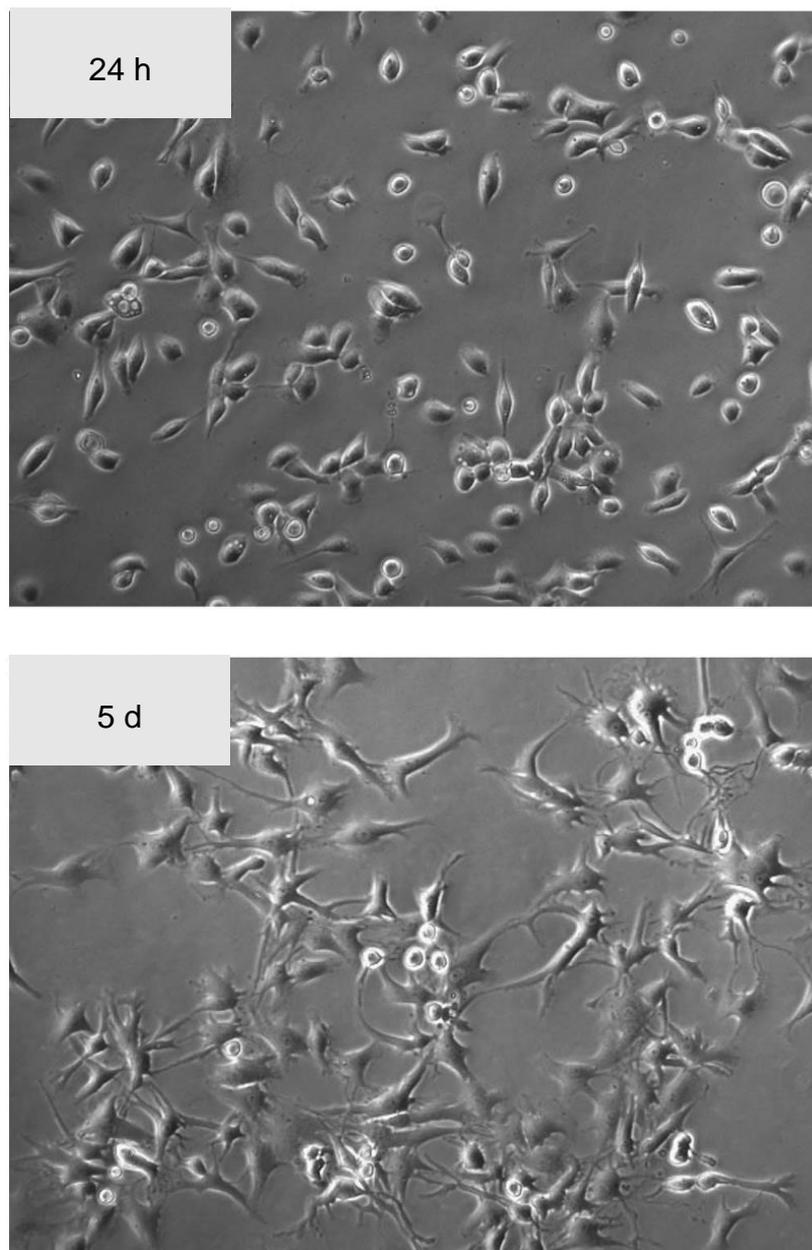
Die arthroskopisch gewonnene Menge an Chondrozyten ist zu gering, um den Knorpeldefekt zu decken. Daher müssen die Chondrozyten *in vitro* kultiviert und expandiert werden. Die Expansion von Chondrozyten erfolgt in einer Monolayer-Kultur, das heißt in einem zweidimensionalen Kultursystem in Zellkulturflaschen, also auf einer Oberfläche aus synthetischen Polymeren. Die Kultivierung von Chondrozyten in einem Monolayer ist ökonomisch und technisch simpel und macht die Gewinnung einer hohen Zellzahl möglich <sup>[11]</sup>. Zweidimensionale Kultursysteme fördern also die Proliferation der Chondrozyten, führen bei längerer Kultivierung jedoch zu einem Verlust des spezifischen

Phänotyps der Zellen sowie zu einer Änderung des Gen- und Expressionsprofils der Chondrozyten. Man spricht von einer Dedifferenzierung der Zellen [9, 11, 17, 20, 33].

Im Zuge der Dedifferenzierung ändert sich die runde oder polygonale Zellform der Chondrozyten in eine flache, längliche Form, die dem Phänotypen fibroblastischer Zellen entspricht (Abbildung 11). Die Synthese der gelenkknorpelspezifischen Matrixbestandteile, wie Kollagen Typ II oder Aggrekan, wird reduziert. Im Gegenzug erhöht sich die Expression gelenkknorpelunspezifischer Matrixbestandteile, wie Kollagen Typ I [33].

Dedifferenzierte Chondrozyten produzieren also keine gelenkknorpelspezifischen Matrixbestandteile mehr und sind daher zur Deckung eines Gelenkknorpeldefektes ungeeignet.

Dedifferenzierte Zellen können in dreidimensionalen (3D) Kultursystemen wieder zu ihrem ursprünglichen Phänotyp zurückgeführt werden [10, 11, 17, 20]. Viele dieser Zellkulturtechniken nutzen Biomaterialien, wie Agarosegel, Alginat und Fibrin, um diese dreidimensionale Umgebung zu erzeugen [11, 17, 23].



**Abbildung 11:** Humane Gelenkchondrozyten in einer Monolayer-Kultur nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden (24 h) und 5 Tagen (5 d). Die Zellen verändern ihre runde oder polygonale Form zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp mit länglichen, flachen Zellen [33].

### 1.5 Zielstellung

Die autologe Knorpelzelltransplantation hat in den letzten Jahren in der Therapie von Gelenkknorpeldefekten Erfolge gezeigt [18, 26, 28, 31]. Die Vermehrung der autologen Chondrozyten auf kommerziell erhältlichen polymeren Oberflächen führt jedoch zu einer Dedifferenzierung der Zellen. Aus diesem Grund steigt die Nachfrage nach optimierten

polymeren Oberflächen, die den differenzierten Phänotyp der artikulären Chondrozyten erhalten und womöglich als medizinisches Produkt anwendbar sind.

Die Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Polystyrol-Zellkulturgefäße für eine Monolayer-Kultur oder die Verwendung neuer Polymere könnten den Phänotyp und das Expressionsprofil der Chondrozyten beeinflussen. Zurzeit gibt es aber kaum Untersuchungen, die diesen möglichen Einfluss auf die Kultivierung artikulärer Chondrozyten beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Polymere Polyetherimid (PEI) und Polystyrol (PS) als Oberflächen für die Kultivierung artikulärer Chondrozyten untersucht.

PEI ist als Material für Medizinprodukte von großem Interesse, da es nicht leitend ist und gegenüber Hitze, mechanischen und chemischen Einflüssen sehr stabil ist. Somit kann PEI dampfsterilisiert werden <sup>[34]</sup>. Ein weiterer Vorteil hinsichtlich des Einsatzes im medizinischen Bereich besteht darin, dass PEI chemisch leicht mit biologisch aktiven Liganden modifiziert werden kann <sup>[35, 36, 37, 38]</sup>. PEI hat während der Zellkultur keine zytotoxischen Auswirkungen auf die Zellen <sup>[39]</sup>. In vorangegangenen Studien wurden porcine Gelenkchondrozyten auf Gerüsten aus PEI -Fasern kultiviert. Dabei zeigte sich das Material als biokompatibel und erlaubte die Anlagerung und das Wachstum von Chondrozyten. Zudem konnte die Synthese von Kollagen Typ II nachgewiesen werden <sup>[40]</sup>.

Neben der Auswahl des geeigneten Polymers gibt es in der vorliegenden Arbeit eine weitere Variable, um den Phänotyp der Chondrozyten während der Expansion zu stabilisieren. Durch ein Anrauen der Oberfläche in verschiedenen Rauigkeitsstufen soll die natürliche 3D Umgebung der Chondrozyten, wie sie im Gelenk vorliegt, imitiert werden und somit möglicherweise eine Dedifferenzierung der Zellen verhindert werden. Zudem soll die angeraute Oberfläche den Zellen viele Adhäsionspunkte bieten und somit die Anlagerung der Zellen an die Oberfläche des Polymers verbessern.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass der Phänotyp und die Proliferation von Chondrozyten durch das Wachstum auf verschiedenen angerauten Titanoberflächen beeinflusst wird <sup>[41, 42]</sup>.

Bei der Testung des Einflusses neuer Biomaterialien auf die Zellen wird gewöhnlich eine Scheibe des zu testenden Materials in die Vertiefungen einer Multiwell-Platte gelegt, auf

der die Zellen wachsen. Der Nachteil eines solchen Vorgehens ist, dass eine Unterscheidung zwischen den Effekten, die durch das Material der Multiwell-Platte und den Effekten, die durch das zu testende Material hervorgerufen werden, nicht vollkommen möglich ist. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Zellkulturinserts aus PEI und PS mittels Spritzguss hergestellt. So wurde sichergestellt, dass die Zellen während der Kultur ausschließlich Kontakt mit dem zu testenden Material haben.

Geprüft wurden die Anlagerung der Chondrozyten an die Zellkultur-Oberfläche, das Wachstum und die Vitalität der Zellen sowie die Genexpression der gelenkknorpelspezifischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan. Als Marker für eine Dedifferenzierung der Zellen diente die Untersuchung der Genexpression des Kollagen Typ I.

Als Kontroll-Oberfläche dienten kommerziell erhältliche 24-Well- und 96-Well-Zellkultur-Kunststoffplatten aus PS mit glatter Oberfläche.

## 2 Material

### 2.1 Inserts

In dieser Arbeit wurden speziell für 24-Well- und 96-Well-Platten angefertigte Inserts aus PEI und PS mit je drei verschiedenen Rauigkeitsstufen der Oberfläche (Tabelle 2, Abbildung 12) verwendet.

Das für die Anfertigung der Inserts verwendete PEI stammte von „General Electric“ (ULTEM ® 1000, General Electric, New York, USA), das PS von BASF (Type 158K, BASF, Ludwigshafen, Deutschland). Beide Polymere wurden unverändert für die weiteren Produktionsschritte genutzt.

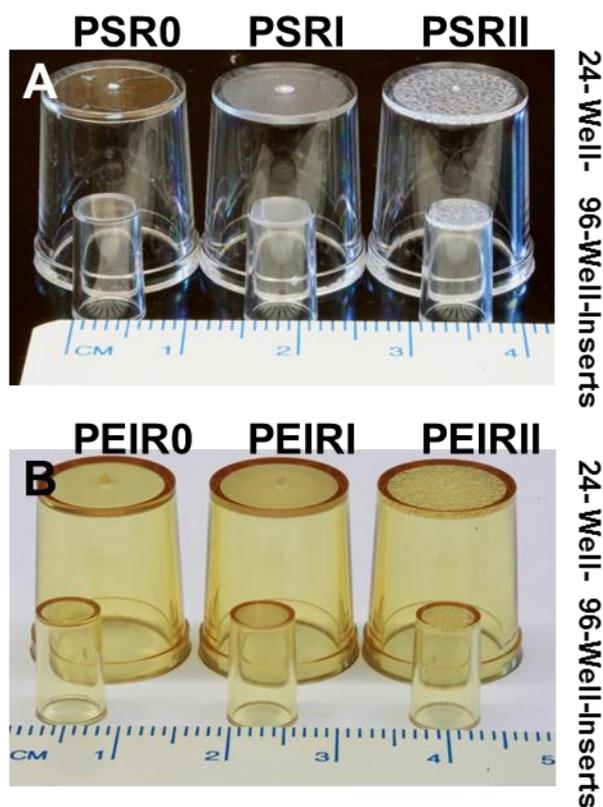
Die Inserts wurden mit je drei verschiedenen Rauigkeitsstufen mittels Spritzguss durch eine Spritzguss-Maschine (Alrounder 270U, Arburg Corp., Münsingen, Schweiz) angefertigt. Das Spritzgussverfahren wird vor allem in der Verarbeitung von Polymeren angewendet. Dabei wird das Polymer zu einer viskosen Flüssigkeit geschmolzen und unter Druck in eine Form gepresst. Die Form und Oberflächenstruktur können dabei beinahe frei gewählt werden. Bereits nach wenigen Sekunden erfolgt die Abkühlung unter Aufrechterhaltung des Drucks zu einer festen Form. Durch dieses Verfahren ist es möglich eine große Stückzahl schnell und kostengünstig herzustellen <sup>[43]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden maßgefertigte Gussformen von „Dreuco Formenbau GmbH“ aus Berlin verwendet. Der obere Außendurchmesser der 24-Well-Inserts betrug 12,4 mm, der untere Außendurchmesser 10,5 mm, die Höhe des Inserts 15 mm und die Wanddicke 1 mm. Der obere Außendurchmesser der 96-Well-Inserts betrug 6,5 mm, der untere Außendurchmesser 5,5 mm, die Höhe des Inserts 11 mm und die Wanddicke 0,5 mm.

Die drei Rauigkeitsstufen der Inserts (Tabelle 2, Abbildung 12) wurden durch die Verwendung von verschiedenen strukturierten Zylindern erzeugt. Dabei diente eine polierte Kontaktfläche der Herstellung der Oberflächen der Rauigkeitsstufe R0 (glatt). Zwei nach DIN 16747 mikrostrukturierte Oberflächen, M 30 und M 45, dienten der Produktion der Oberflächen der Rauigkeitsstufen RI (mittelrau) und RII (rau) <sup>[44, 45]</sup>.

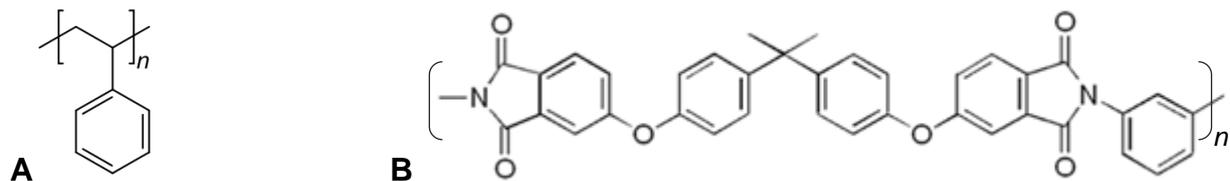
**Tabelle 2:** Rauigkeitsstufen der Polystyrol- und Polyetherimid-Zellkulturinserts

Muster-Nummer	Rauigkeitsstufe	R <sub>q</sub> [µm]
PS24R0	R0	0,29 ± 0,07
PS24RI	RI	3,47 ± 0,28
PS24RII	RII	22,16 ± 0,64
PEI24R0	R0	0,23 ± 0,07
PEI24RI	RI	3,92 ± 0,20
PEI24RII	RII	22,65 ± 0,80
PS96R0	R0	0,12 ± 0,04
PS96RI	RI	3,52 ± 0,26
PS96RII	RII	16,04 ± 1,24
PEI96R0	R0	0,14 ± 0,05
PEI96RI	RI	4,14 ± 0,32
PEI96RII	RII	13,38 ± 0,79

**Abbildung 12:** Maßgefertigte PS- (A) und PEI-Inserts (B). Der Boden mit den unterschiedlichen Rauigkeitsstufen zeigt nach oben.

Das PS wurde während des Gussverfahrens auf Temperaturen zwischen 210 °C und 230 °C, das PEI auf Temperaturen zwischen 320 °C und 380 °C erhitzt. Alle Inserts wurden vor ihrer Verwendung sterilisiert. Die PS-Inserts wurden unter Verwendung des Gases Ethylenoxid sterilisiert (10 % Ethylenoxid, 54 °C, 65 % relative Luftfeuchtigkeit, 1,7 bar, 3 Stunden Gasexposition, 21 Stunden Belüftungsphase). Die Sterilisation der PEI-Inserts erfolgte durch 121 °C heißen Dampf bei 2 bar für 20 Minuten unter Verwendung des Systec Autoklaven D-65 (Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland) [44].

Die chemische Struktur der Kunststoffe ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13:** Chemische Strukturen von Polystyrol (A) und Polyetherimid (B) [46]

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Versuchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Versuchsmaterialien sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

**Tabelle 3:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz / Enzym	Firma
Alamar Blue® Färbelösung	Invitrogen™, USA
Alcianblau 8GX, 1 %	Carl Roth GmbH, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biochrom AG, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, DE
Eselserum (Donkey-Serum)	Chemicon, USA
Essentielle Aminosäuren, 50x MEM-AS	Biochrom AG, DE
Essigsäure, 96 %	Merck KGaA, DE
Ethanol, 70 %	Merck KGaA, DE
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, DE
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich, USA
Fluoromount	Southern Biotech, USA
Gentamycin	Biochrom AG, DE
Ham's F12	Biochrom AG, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, DE
Paraformaldehyd, 4 %	Carl Roth GmbH, DE
Partricin, 50 µg/ml	Biochrom AG, DE
Penicillin, 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, DE
Roticlear	Carl Roth GmbH, DE
Streptomycin, 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck KGaA, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau, 1 %	Biochrom AG, DE
Trypsin / EDTA	Biochrom AG, DE
Vitamin C (Ascorbinsäure, 25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, DE

**Tabelle 4:** Verwendetes Versuchsmaterial

Versuchsmaterial	Firma
BD Falcon 15/25 ml	BD Biosciences, USA
Eppendorfcup 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf AG, DE
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, DE
Glasplättchen	VWR, DE
Insulinspritze 10 ml	BD, USA
Serologische Pipetten	Eppendorf AG, DE
Scraper 24 cm	TPP, CH
Spritzen Plastipak und Kanülen 22G	BD, ES
Sterile Pinzetten	Aesculap, DE
Objekträger und Deckgläser	Menzel, DE
Zählkammer	VWR, DE
Zellkulturflasche Cell plus T175	Sarstedt AG, DE
Zellkulturflasche Cell plus T75	Sarstedt AG, DE
Zellkulturplatte Cell plus 6-Well	Sarstedt AG, DE
Zellkulturplatte Cell plus 24-Well	Sarstedt AG, DE
Zellkulturplatte Cell plus 96-Well	Sarstedt AG, DE

### 2.3 Medien und Puffer

Die Zusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Medien und Puffer ist in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Verwendete Medien in der Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
DMEM / Ham's-Medium	48 % Ham's F12 (Biochrom AG, DE) 48 % DMEM (Biochrom AG, DE) 1 % essentielle Aminosäuren (Biochrom AG, DE) 1 % Partricin (Biochrom AG, DE) 1 % Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG, DE) 1 % Vitamin C (Biochrom AG, DE) 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, DE)
Kulturmedium	90 % DMEM / Ham's-Medium 10 % FKS (Biochrom AG, DE)
Einfriermedium	90 % FKS (Biochrom AG, DE) 10 % DMSO (Carl Roth GmbH, DE)
Poly-L-Lysin-Lösung	99 % PBS (Biochrom AG, DE) 1 % Poly-L-Lysin (Biochrom AG, DE)

**Tabelle 6:** Weitere verwendete Medien und Puffer

	Medium / Puffer		
	Alamar Blue	Lebend-Tot-Färbung	cDNA-Synthese Puffer
Zusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Alamar Blue® Färbelösung (Resazurin)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 3 mg/ml Fluoresceindiacetat (FDA)-Stammlösung (= 3 mg FDA in 1 ml Aceton)</li> <li>– Ethidiumbromid (EtBr)-1% Stammlösung</li> <li>– 1 ml 1xPBS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– gDNA Wipeout Puffer</li> <li>– Quantiscript RT Puffer</li> <li>– Reverse Transkriptase</li> <li>– RNase freies Wasser</li> <li>– RT Primer Mix</li> <li>– Template-RNA</li> </ul>

## 2.4 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Verwendete Primer

Primer	Firma	5'-3'-Primesequenz	Assay-ID	Genreferenz (mRNA)	Amplifikationsgröße (bp)
Humanes CoL2A1	ABI	*	Hs00264051_m	NM_033150.2	124
Sus Scrofa ACAN	ABI	*	Ss03374823_m1	NM_00116465	60
Sus Scrofa ACTB	ABI	*	Ss03376081_u1	AK237086.1	77
Maus ACTB	Qiagen	TGGGACGACATGGAGAA (F) GAAGGTCT-CAAACATGATCTGG (R) GCCCCCCT-GAACCCTAA (P)	241014	NM_007393	147
Humanes COL1A1	Qiagen	GGCAACGATGGTGCTAA (F) GACCAGCATCAC-CTCTGTC (R) AATGCCTGGT-GAACGTG (P)	241462	NM_000088	138

\* Vom Hersteller nicht veröffentlicht

F = Forward Primer, R = Reverse Primer, P = Probe, bp = Basenpaare, ABI = Applied Biosystems by Life Technologies Ltd (Darmstadt, DE), Qiagen = Qiagen GmbH (Hilden, DE)

## 2.5 Kits

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:** Verwendete Kits

Verfahren	Kit/Firma
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE
cDNA-Synthese	Quantitec Reverse Transcription Kit, Qiagen, DE
PCR	TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, USA
	Quantitec Gene Expression Assay, Qiagen, DE

## 2.6 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9:** Verwendete Geräte

Laborgeräte	Firma
CO <sub>2</sub> -Brutschrank, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	Thermo scientific, DE
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, DE
Gradienteneinfriergefäß	BIOSAFE®, Cryotherm
Invertmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, DE
Kamera Color View II	Olympus Europa Holding GmbH, DE
Kryostat	Microm, DE
Mastercycler	Eppendorf, DE
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo scientific, DE
Opticon I – Real Time Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Sterilbank, Holten Laminair	Thermo scientific, DE
Tisch-Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, DE
Tecan SpectraFluor Microplate Reader	Tecan Trading AG, CH
Thermo-Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, DE
Wasserbad	Thermo scientific, DE
Zentrifuge Multifuge 1S	Heraeus, UK

## 2.7 Software

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Software ist in der Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10:** Verwendete Software

Verfahren	Software/Firma
Graphen und Statistik	Graphpad Prism 5, GraphPad Software, Inc., USA
Mikroskopie	CellID Imaging Software, Olympus Europa Holding GmbH, DE
PCR	Opticon Monitor 3.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
RNA – Konzentrationsmessung	Nano-Drop ND-1000 V 3.7.0, Thermo scientific, DE
Tabellenkalkulation	Microsoft Office Excel, Microsoft Corporation, USA
Textverarbeitung	Microsoft Office Word, Microsoft Corporation, USA

### 3 Methodik

Um den Einfluss der Kunststoffe PEI und PS sowie der unterschiedlichen Rauigkeit der Oberfläche zu testen, wurden porcine Gelenkchondrozyten auf den unterschiedlich angerauten Oberflächen der Kunststoffinserts aus PEI und PS kultiviert. Die kultivierten Zellen wurden im Anschluss vier verschiedenen Tests unterzogen: einer lichtmikroskopischen Analyse zur Kontrolle der Morphologie und Adhärenz der Zellen, einem Alamar-Blue-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen, einer Lebend-Tot-Färbung zur Überprüfung der Vitalität der Zellen und einer PCR zur Untersuchung der Genexpression der Zellen. Alle Tests wurden als Kontrolle ebenfalls mit Chondrozyten durchgeführt, die auf kommerziell erhältlichen 24-Well- und 96-Well-Zellkultur-Kunststoffplatten kultiviert worden sind. Für die Auswertung der Lebend-Tot-Färbung dienten Glasplättchen als Kontrolloberfläche.

Im Folgenden werden alle Arbeitsschritte der Zellkultur sowie der durchgeführten Versuche beschrieben.

#### 3.1 Zellkultur

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden porcine Gelenkchondrozyten von zwölf Hausschweinen (3 – 6 Monate alte Hybrid-Schweine) verwendet. Der Knorpel wurde postmortal aus dem femoropatellaren Gleitlager, den Femurkondylen des Kniegelenks sowie von der Rückseite der Patella (Facies posterior) entnommen. Der gewonnene Knorpel wurde anschließend im Transportmedium (PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Gentamycin) in das Labor transportiert.

In der Tabelle 11 sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spender aufgelistet.

Tabelle 11: Verwendete Spender

Spender, Passage	Lichtmikroskopische Fotodokumentation	Alamar Blue Test	LT-Färbung	PCR
PGC2 P3		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII	Kontrolle, PS R0	Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII
PGC6 P3	Nach 48h Zellkultur, Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII			
PGC27 P2	Nach 72h Zellkultur, Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII			
PGC32 P2		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII
PGC34 P3		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0		Kontrolle, PS R0 PEI R0 – PEI RII
PGC38 P2		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII	Kontrolle, PS R0	
PGC40 P2	Nach 48h Zellkultur, Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII	Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII
PGC42 P3		Kontrolle, PS R0, PEI R0	Kontrolle, PS R0, PEI R0	
PGC48 P3		Kontrolle, PS R0, PEI R0	Kontrolle, PS R0, PEI R0	
PGC51 P3		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0		Kontrolle, PEI R0 – PEI RII
PGC52 P2	Nach 72h Zellkultur, Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII			
PGC54 P3		Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII	Kontrolle, PS R0	Kontrolle, PS R0 – PS RII, PEI R0 – PEI RII
Gesamt	PS R0: 4x PS RI: 4x PS RII: 4x PEI R0: 4x PEI RI: 4x PEI RII: 4x	PS R0: 9x PS RI: 7x PS RII: 7x PEI R0: 9x PEI RI: 3x PEI RII: 3x	PS R0: 5x PS RI: - PS RII: - PEI R0: 2x PEI RI: - PEI RII: -	PS R0: 5x PS RI: 4x PS RII: 4x PEI R0: 6x PEI RI: 6x PEI RII: 6x

pGC: porcine Gelenkchondrozyten

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Arbeitsmaterialien (Glaswaren, Pinzetten etc.) wurden vor ihrer Nutzung in einem Autoklaven sterilisiert oder waren steril verpackte Einmalartikel (z.B. Pipetten).

### 3.1.1 Chondrozytenisolierung

Das aus den Kniegelenken der Hausschweine entnommene Knorpelmaterial wurde mit einem Skalpell in ca. 1 mm große Stücke zerkleinert und mit PBS gespült. Anschließend folgte der enzymatische Verdau der Knorpelfragmente mit 2 % Pronase ( $7 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), 1:1 verdünnt mit DMEM / Ham's-Medium für eine Stunde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Brutschrank auf dem Rotationsmischer. Im Anschluss erfolgte der Verdau mit 0,1 % (w/v) Kollagenase ( $\geq 0.1 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) verdünnt mit Wachstumsmedium,  $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ascorbinsäure,  $50 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$  Streptomycin,  $50 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$  Penicillin,  $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Partricin, und essentiellen Aminosäuren für 16 Stunden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Brutschrank. Die isolierten Chondrozyten wurden in Wachstumsmedium resuspendiert, das mit 10 % FKS ergänzt wurde. Darauf folgte die Aussaat der Chondrozyten in Zellkulturflaschen ( $2,8 \times 10^4 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^2$ ) und die Kultivierung der Zellen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Inkubator.

### 3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Chondrozyten

Um die Chondrozyten nach der Isolation auch noch zu einem späteren Zeitpunkt für die Versuche zu erhalten, wurden sie in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  kryokonserviert. Zuvor wurden die adhärenen Zellen in den Zellkulturflaschen mit PBS gespült und anschließend mithilfe von Trypsin (0,1 % Trypsin in PBS) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach 3 Minuten Einwirkzeit wurde die Wirkung des Trypsin durch Zugabe von 10 % FKS in DMEM/Ham's-Medium (Tabelle 5) aufgehoben. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min lang bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden in 1,8 ml Einfriermedium (Tabelle 5) in Kryoröhrchen gefüllt, welche schonend mittels eines Gradienten-Einfriergefäßes um ein Grad Celsius pro Minute innerhalb von 24 Stunden abgekühlt wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen 90 Sekunden lang in ein  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad gelegt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in eine mit 20 ml Kulturmedium (Tabelle 5) befüllte und für einige Minuten im Brutschrank vorgewärmte

sterile Zellkulturflasche (T175) gegeben. Die Zellkulturflasche wurde zur Kultivierung der Chondrozyten im Anschluss wieder in den Brutschrank gelegt. Die Kultivierung der Chondrozyten erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 Expansion der Chondrozyten

Die kultivierten Chondrozyten wurden täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Jeden zweiten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 %, also einer beinahe vollständigen Bedeckung des Zellkulturflaschenbodens mit adhärennten Chondrozyten, wurden das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend trypsiniert. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurde die Wirkung des Trypsin lichtmikroskopisch beurteilt und nach Ablösen des Zellrasens von der Zellkulturflasche durch Zugabe von 5 ml 10 % FKS in DMEM/Ham's-Medium (Tabelle 5) aufgehoben. Die Zellsuspension wurde in einem Falcon 5 Minuten lang bei 400 g zentrifugiert. Das Medium über dem durch die Zentrifugation entstandenen Zellpellet wurde abgesaugt und die Zellen wurden unter Zugabe von neuem Kulturmedium auf zwei sterile Zellkulturflaschen aufgeteilt. Diesen Vorgang nennt man „Passagierung“ oder „Umsetzen“. Die kultivierten Chondrozyten erhalten je nach Anzahl der Passagierungen die Zusatzbezeichnung mit der entsprechenden Passagernummer P(x).

### 3.1.4 Zellzählung

Die vitalen Chondrozyten wurden nach ihrer Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden die Zellen mithilfe von Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Zugabe von 5 ml 10 % FKS in DMEM/Ham's-Medium wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang bei 400 g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml DMEM/Ham's-Medium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau vermischt und im Anschluss auf die Neubauer-Zellkammer aufgetragen. Vitale Zellen sind in der Lage, Trypanblau auszuschließen. Sie erscheinen unter dem Lichtmikroskop hell. Tote Zellen hingegen nehmen den Farbstoff auf und sind daher tiefblau gefärbt. Gezählt werden nur die hellen, vitalen Zellen. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

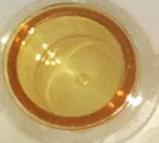
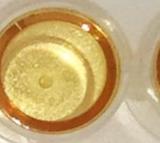
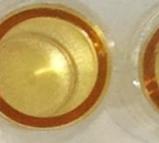
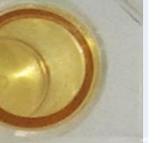
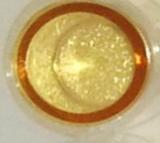
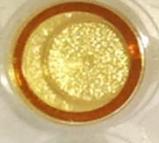
$$\text{Zellanzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzählung} \times 3 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.1.5 Aussaat der Chondrozyten in die Inserts

Bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl in der Zellzählung wurden  $6,0 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  der zuvor in den Zellkulturflaschen kultivierten porcinen Gelenkchondrozyten (Passagen 1 – 3) in die 24-Well-Inserts pipettiert und 24 – 72 Stunden lang kultiviert. Je Spender wurden drei bis vier Zellkulturinserts pro Muster sowie die entsprechende Anzahl an Wells der kommerziell erhältlichen 24-Well-Platte als Kontrolle mit Zellen bestückt (Abbildung 14). Die Zellen der 24-Well-Platte wurden im weiteren Verlauf für die lichtmikroskopischen Fotodokumentation, die Lebend-Tot-Färbung und/oder die Genexpressionsanalyse verwendet.

	1	2	3	4	5	6
A	PEI RO	PEI RO	PEI RO	PEI RI	PEI RI	PEI RI
B	PEI RII	PEI RII	PEI RII	PS RO	PS RO	PS RO
C	PS RI	PS RI	PS RI	PS RII	PS RII	PS RII
D	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle			

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

**Abbildung 14:** Zellkulturschema der 24-Well-Platten. Schema einer kommerziell erhältlichen 24-Well-Platte mit je drei Zellkulturinserts pro Material und Rauigkeitsstufe sowie drei Wells ohne Insert als Kontrolle (oben) und Foto einer dem oberen Schema entsprechenden 24-Well-Platte ohne Zellen (unten).

Für den Alamar Blue-Test wurden  $2,8 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in die 96-Well-Inserts ausgesät. Pro Material und Rauigkeitsstufe wurden drei Inserts sowie drei Wells ohne Inserts mit Zellen bestückt (Abbildung 15). Die Zellen wurden 24 Stunden lang kultiviert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	H <sub>2</sub> O									
B	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PS R0	PS RII	SDS PS RI	AB+M PS R0	AB+M PS RII	M PS RI	H <sub>2</sub> O
C	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PS R0	PS RII	SDS PS RI	AB+M PS R0	AB+M PS RII	M PS RI	H <sub>2</sub> O
D	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PS R0	PS RII	SDS PS RI	AB+M PS R0	AB+M PS RII	M PS RI	H <sub>2</sub> O
E	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PS RI	SDS PS R0	SDS PS RII	AB+M PS RI	M PS R0	M PS RII	H <sub>2</sub> O
F	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PS RI	SDS PS R0	SDS PS RII	AB+M PS RI	M PS R0	M PS RII	H <sub>2</sub> O
G	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PS RI	SDS PS R0	SDS PS RII	AB+M PS RI	M PS R0	M PS RII	H <sub>2</sub> O
H	H <sub>2</sub> O									

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	H <sub>2</sub> O									
B	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PEI R0	PEI RII	SDS PEI RI	AB+M PEI R0	AB+M PEI RII	M PEI RI	H <sub>2</sub> O
C	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PEI R0	PEI RII	SDS PEI RI	AB+M PEI R0	AB+M PEI RII	M PEI RI	H <sub>2</sub> O
D	H <sub>2</sub> O	AB+M	Ko	PEI R0	PEI RII	SDS PEI RI	AB+M PEI R0	AB+M PEI RII	M PEI RI	H <sub>2</sub> O
E	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PEI RI	SDS PEI R0	SDS PEI RII	AB+M PEI RI	M PEI R0	M PEI RII	H <sub>2</sub> O
F	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PEI RI	SDS PEI R0	SDS PEI RII	AB+M PEI RI	M PEI R0	M PEI RII	H <sub>2</sub> O
G	H <sub>2</sub> O	M	SDS	PEI RI	SDS PEI R0	SDS PEI RII	AB+M PEI RI	M PEI R0	M PEI RII	H <sub>2</sub> O
H	H <sub>2</sub> O									

**Abbildung 15:** Schemata der 96-Well-Platten für den Alamar Blue-Test. H<sub>2</sub>O = steriles Wasser, AB = Alamar Blue-Lösung, M = Kulturmedium, Ko = Kontrolle, SDS = Natriumdodecylsulfat, PS = Polystyrol, PEI = Polyetherimid, R0 = glatte Oberfläche, RI = mittelraue Oberfläche, RII = raue Oberfläche, gelb hinterlegt = Inserts mit Zellen. Aus Gründen der Übersicht wurden die leeren Reihen 11 und 12 der 96-Well-Platte im Schema nicht berücksichtigt.

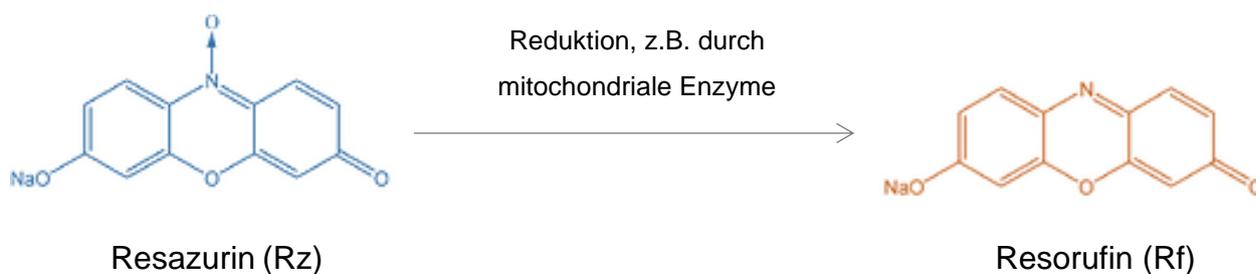
### 3.2 Nachweis der Morphologie und Adhärenz der Chondrozyten mittels lichtmikroskopischer Analyse

Die Morphologie und Adhärenz der auf den beiden verschiedenen Kunststoffen mit ihren unterschiedlichen Rauigkeitsstufen sowie der auf den kommerziell erhältlichen Wells kultivierten Chondrozyten wurde nach 48 Stunden lichtmikroskopisch untersucht und fotodokumentiert. Die Größe der Zellcluster wurde von zwei verschiedenen Spendern nach 48 Stunden Zellkultur und von zwei weiteren Spendern nach 72 Stunden Zellkultur mithilfe der Software Cell D in drei verschiedenen Sichtfeldern gemessen und verglichen.

### 3.3 Kontrolle der metabolischen Aktivität der Chondrozyten mittels Alamar Blue Assay

Die Zytotoxizität der Zellkulturinserts wurde anhand der Analyse der metabolischen Aktivität der in den 96-Well-Inserts kultivierten porcinen Gelenkchondrozyten ( $2,8 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) beurteilt. Als Kontrolle dienten die Chondrozyten, die in den Wells der kommerziell erhältlichen 96-Well-Platte kultiviert wurden.

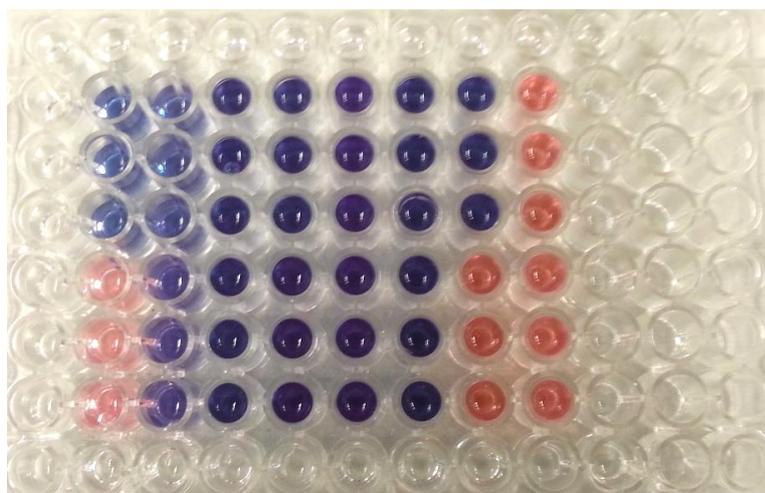
Zur Kontrolle der Zellvitalität wurde das Alamar Blue Assay genutzt. Alamar Blue ist ein Reagenz, das zur Quantifizierung metabolischer Aktivität von Zellen verwendet wird. Es besteht aus dem nicht-fluoreszierenden blauen Molekül Resazurin. Resazurin ist nicht zytotoxisch und wird unter anderem durch mitochondriale Enzyme vitaler Zellen reduziert und so in das hoch-fluoreszierende rote Resorufin umgewandelt (Abbildung 16). Der Farbwechsel und der Wechsel der Fluoreszenz erlauben durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen im Tecan SpectraFluor Microplate Reader die direkte Bestimmung der metabolischen Aktivität der zu untersuchenden Zellen. Durch die Höhe der metabolischen Aktivität der Zellen können Rückschlüsse auf die Konzentration vitaler Zellen einer Probe gezogen werden <sup>[47]</sup>.



**Abbildung 16:** Reduktion von Resazurin zu Resorufin.

Das Alamar Blue Assay wurde in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt neun verschiedenen Spendern durchgeführt, wobei neunmal PS-Inserts mit glatter Oberfläche, siebenmal PS-Inserts mit mittelrauer und siebenmal PS-Inserts mit rauer Oberfläche sowie neunmal PEI-Inserts mit glatter Oberfläche, dreimal PEI-Inserts mit mittelrauer und siebenmal PEI-Inserts mit rauer Oberfläche getestet wurden (Tabelle 11).

Es wurden  $2,8 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in die 96-Well-Inserts ausgesät und 24 Stunden lang im Brutschrank inkubiert (bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$ ). Pro Material und Rauigkeitsstufe wurden drei Inserts sowie als Kontrolle drei Wells ohne Inserts mit Zellen und Kulturmedium mit  $10\%$  Alamar Blue-Lösung bestückt. Als Negativkontrolle dienten jeweils drei Wells mit Zellen, denen  $10^{-3} \text{mol/L}$  Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt wurde (Abbildung 15 und Abbildung 17). Das SDS induzierte in diesen Wells den Zelltod. Die Platten wurden stündlich über  $5 - 8$  Stunden und nach 24, 25 und 26 Stunden durch den Tecan SpectraFluor Microplate Reader bei einer Wellenlänge von  $570 \text{nm}$  und einer Referenz-Wellenlänge von  $595 \text{nm}$  ausgelesen.

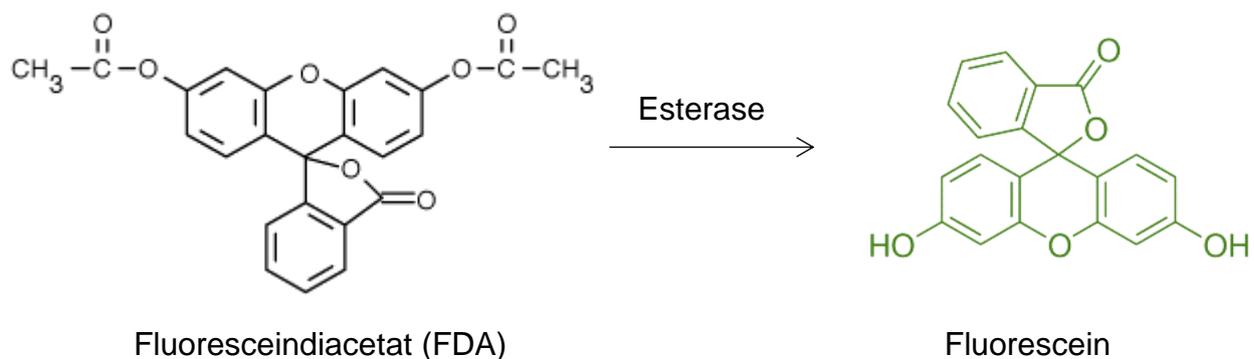


**Abbildung 17:** Foto einer 96-Well-Platte für den Alamar Blue-Test mit Polystyrol-Inserts nach dem in Abbildung 14 dargestellten Schema.

### 3.4 Ermittlung der Vitalität der Chondrozyten durch Lebend-Tot-Färbung

Die Vitalität der auf den Zellkulturinserts kultivierten porcinen Gelenkchondrozyten wurde mithilfe der Lebend-Tot-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Lebend-Tot-Färbung ist eine Doppel-Färbemethode, bei der die vitalen und toten Zellen einer Probe gleichzeitig durch zwei verschiedene Reagenzien angefärbt werden. Dabei reagieren lebende Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceindiacetat (FDA) und nehmen eine leuchtend grüne Farbe an. Tote oder beschädigte Zellen werden durch den rot fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt <sup>[48]</sup>. FDA ist ein unpolarer und somit membrandurchgängiger Farbstoff, der zunächst nicht fluoresziert. Nach Durchdringen der Zellmembran stoffwechselaktiver Zellen werden die Acetyl-Reste des Farbstoffes durch eine Esterase enzymatisch abgespalten (Abbildung 18). Das so entstandene Fluorescein ist nun polar und kann die intakte Zellmembran nicht mehr passieren. Es verbleibt somit im Inneren der Zelle. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint das Fluorescein ( $Ex_{Max}$  495 nm/  $Em_{Max}$  525 nm) leuchtend grün und markiert somit alle stoffwechselaktiven Zellen.



**Abbildung 18:** Enzymatische Spaltung des nicht fluoreszierenden Farbstoffes Fluoresceindiacetat zum grün fluoreszierenden Fluorescein.

EtBr kann die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren. Die beschädigte Zellmembran toter Zellen kann es dagegen durchdringen. Im Zellinneren lagert sich das EtBr an die DNA der Zelle an. Es wird durch UV-Licht (254 nm) angeregt und fluoresziert orange-rot ( $Em_{Max}$  605 nm).

Die Lebend-Tot-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt fünf Spendern durchgeführt (Tabelle 11). Um die Betrachtung der Zellen unter dem

Fluoreszenzmikroskop zu ermöglichen, wurden die Zellen für die Lebend-Tot-Färbung auf Zellkulturinserts mit abnehmbarem Boden kultiviert (Abbildung 19). Als Kontrolloberfläche dienten Glasplättchen.



**Abbildung 19:** Zellkulturinsert mit abnehmbarem Boden für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

Mit abnehmbarem Boden standen nur Inserts mit glatter Oberfläche zur Verfügung (PS R0, PEI R0). Nachdem bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zellen der ersten beiden Spender eine erhebliche Eigenfluoreszenz des PEI festgestellt wurde, wurden für die darauffolgenden Färbungen nur noch Zellen auf PS kultiviert.

Je nach zur Verfügung stehender Zellzahl wurden je zwei Inserts und Glasplättchen mit 40.000 bis 100.000 Zellen bestückt (Abbildung 20). Dabei wurden pro Spender jeweils zwei verschiedene Mengen an Zellen eingesetzt, um bei zu geringem oder zu dichtem Zellwachstum dennoch ein verwendbares Bild zu erhalten.

Die Zellen wurden 48 Stunden lang im Brutschrank inkubiert (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Nach Spülen eines Wells mit PBS erfolgte die Zugabe von 200 µl der Lebend-Tot-Färbelösung. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde das Glasplättchen bzw. der Insertboden mit einer Pinzette entnommen und erneut vorsichtig mit PBS gespült. Im Anschluss erfolgte die sofortige Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Fotodokumentation. Die Fluoreszenz des EtBr bzw. des FDA wurden dabei mit entsprechenden Filtern im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Diese Arbeitsschritte wurden nacheinander mit allen Inserts bzw. Glasplättchen wiederholt.

	1	2	3	4	5	6
A	Ko z.B. 80.000 Zellen	PS R0 z.B. 80.000 Zellen	PEI R0 z.B. 80.000 Zellen			
B	Ko z.B. 100.000 Zellen	PS R0 z.B. 100.000 Zellen	PEI R0 z.B. 100.000 Zellen			
C						
D						

**Abbildung 20:** Schema der 24-Well-Platten für die Lebend-Tot-Färbung. 24-Well-Platte mit je zwei Zellkulturinserts pro Material sowie zwei Wells mit Glasplättchen (Kontrolle) mit jeweils unterschiedlicher Zellzahl.

### 3.5 Genexpressionsanalyse mittels RTD-PCR

RTD-PCR steht für „Real-Time Detection Polymerase Chain Reaction“ („Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion“), auch bekannt als „quantitative Polymerase Chain Reaction“ („quantitative Polymerase-Kettenreaktion“, qPCR). Die RTD-PCR ermöglicht über die Messung von Fluoreszenzsignalen die Beobachtung der quantitativen Zunahme der cDNA-Amplifikation in Echtzeit. Dazu wird die RNA in jeder Probe in cDNA umgeschrieben und die Proben nach Amplifizierung mit Fluorophor-gekoppelten Primern in einem Thermocycler angeleuchtet und deren Fluoreszenz bestimmt. Die Fluoreszenzsignale werden dabei von fluoreszenzgekoppelten Primern während ihrer Bindung an die cDNA emittiert. Je größer das Fluoreszenzsignal ist, desto größer ist die Menge der zu untersuchenden cDNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RTD-PCR genutzt, um die Genexpression der gelenkknorpelspezifischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrekan sowie, als Marker für eine Dedifferenzierung, die Genexpression des Kollagen Typ I zu messen. Untersucht wurden porcine Gelenkchondrozyten der Passage 2 – 3, die für 48 Stunden in 24-Well-Inserts kultiviert wurden. Es wurden insgesamt sechs verschiedene Spender

untersucht, wobei fünfmal PS-Inserts mit glatter Oberfläche, viermal PS-Inserts mit mittelrauer und viermal PS-Inserts mit rauer Oberfläche sowie sechsmal PEI-Inserts mit glatter Oberfläche, sechsmal PEI-Inserts mit mittelrauer und sechsmal PEI-Inserts mit rauer Oberfläche getestet wurden (Tabelle 11). Die unterschiedlichen Versuchszahlen resultierten daraus, dass aus den Chondrozyten, die auf PS kultiviert wurden, teilweise nur wenig suffiziente RNA isoliert werden konnte. Aus diesem Grund wurden bei unzureichender Zellzahl die Zellen nur in den PEI-Inserts ausgesät. Als Kontrolloberfläche dienten kommerziell erhältliche 24-Well-Zellkultur-Kunststoffplatten aus PS mit glatter Oberfläche.

In Vorbereitung auf die RTD-PCR wurde die RNA aus den artikulären Chondrozyten isoliert, deren Konzentration bestimmt und mittels der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Schritte werden im Folgenden näher beschrieben.

### 3.5.1 RNA-Isolation

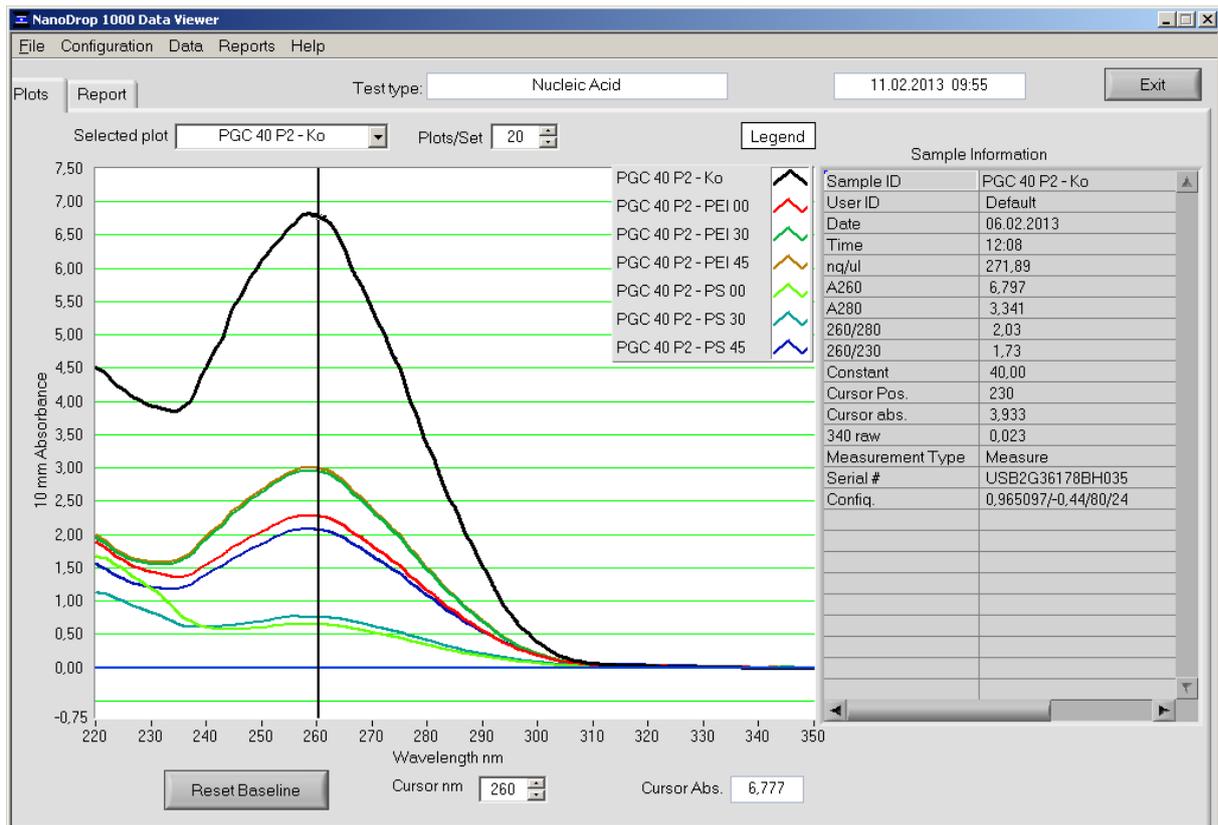
Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit® der Firma Qiagen. In allen Arbeitsschritten wurden RNase-freie Gefäße verwendet sowie alle Arbeitsflächen und Handschuhe mit „RNase-Away“ (Carl Roth GmbH, Deutschland) gereinigt.

Zuerst wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gespült, um sie von den Resten des Mediums zu befreien. Die Knorpelzellen wurden daraufhin mittels des RLT-Lysepuffers lysiert. Dabei wurde der Lysepuffer pro 1 ml mit 10 µl Beta-Mercaptoethanol versetzt. 200 µl des Lysepuffers wurden pro Well auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurde die Lösung mit einer sterilen Pipette resuspendiert und die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgekratzt. Der Inhalt der jeweils drei gleichen Inserts bzw. Wells wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Um sicher zu gehen, dass alle Zellen lysiert sind, wurde die Zellsuspension im Anschluss vorsichtig zehn Mal mithilfe einer sterilen 1 ml Insulinspritze mit einer 22G Kanüle homogenisiert. Zu der Zellsuspension wurden je Eppendorf-Röhrchen 600 µl 70 % Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O zugegeben und gut vermischt. 600 µl der Zellsuspension jedes Eppendorf-Röhrchen wurden anschließend auf je eine Filtrationssäule mit Silikatmembran aufgetragen und für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Filtration der restlichen 600 µl der

Zellsuspension auf dieselbe Weise. Durch die Zugabe des Ethanols werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der RNA und der Silikatmembran gebildet, wodurch die RNA an die Silikatmembran gebunden wird. Um Verunreinigungen durch Proteine und andere Bestandteile der Zellsuspension aus der Membran zu entfernen, wurden als Waschpuffer 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben und die Säulen für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nun folgte der DNase-Verdau durch Zugabe von 10 µl DNase (Qiagen) und 70 µl RDD-Puffer auf jede Säule mit einer Einwirkzeit von 15 Minuten. Nach der erneuten Waschung der Säulen durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation bei 8000 x g für 15 Sekunden wurden 500 µl RPE-Puffer auf jede Säule aufgetragen und bei 8000 x g 30 Sekunden lang zentrifugiert. Im Anschluss erfolgten die erneute Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und die Zentrifugation für 2 Minuten bei 8000 x g. Alle Säulen wurden auf neue 2 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt und für eine Minute bei 16110 x g zentrifugiert. Abschließend wurden die Säulen auf RNase-freie 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt, 23 µl RNase-freies Wasser aufgetragen und für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Durch das RNase-freie Wasser werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der RNA und der Silikatmembran gelöst und die RNA im Eppendorf-Röhrchen aufgefangen. Dieser Schritt wurde nochmals mit dem eben durchgelaufenen Filtrat wiederholt, bevor die Konzentration und Reinheit der so gewonnen RNA mithilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer gemessen wurde. Die restliche RNA wurde bei -80 °C im Eppendorf-Röhrchen für weitere Arbeitsschritte gelagert.

### 3.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurde aus jeweils 1 µl der RNA-Lösung mithilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt. Dabei werden die Nukleinsäuren spektralphotometrisch gemessen. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, wohingegen Proteine und andere Verunreinigungen bei ca. 280 nm absorbieren. Aus dem Verhältnis zwischen der Absorption der Nukleinsäuren und der Absorption der Proteine (260 nm/280 nm) kann auf die Reinheit der RNA geschlossen werden. Der Quotient einer reinen RNA-Lösung liegt bei ca. 2. Das NanoDrop-Spektrophotometer besitzt zusätzlich die Funktion einer graphischen Darstellung des Absorptionsspektrums der Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Beispiel eines RNA-Absorptionsspektrums. RNA-Absorptionsspektrum der Probe PGC 40 P2, gemessen durch das NanoDrop 1000 Spectrophotometer aus 1 µl der RNA-Lösung. Die X-Achse zeigt den Bereich der Wellenlängen in nm, die Y-Achse die 10 mm Absorption. Ausgewählt sind die Daten der Kontrollprobe (PGC 40 P2 - Ko), die am rechten Bildausschnitt angezeigt werden.

Die durch das NanoDrop-Spektrophotometer gemessenen RNA-Konzentrationen dienen als Berechnungsgrundlage für die reverse Transkription.

### 3.5.3 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription wurde die im vorigen Schritt gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Es wurde nur diejenige RNA umgeschrieben, die hinsichtlich der Konzentration und des Reinheitsgrades geeignet war. Für die reverse Transkription wurde das QuantiTec Reverse Transcription Kit® der Firma Qiagen genutzt. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Im ersten Schritt wurde die genomische DNA, die zu Störungen der DNA-Amplifikation während der PCR führen kann, entfernt. Dazu wurden 500 ng RNA jeder Probe mit 2 µl gDNA Wipeout-Buffer versehen und anschließend mit RNase-freiem Wasser zu einer Probenmenge von 14 µl ergänzt. Die Proben wurden nun für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und im Anschluss 3

Minuten lang auf Eis abgekühlt. Im zweiten Arbeitsschritt wurde die cDNA synthetisiert. Hierfür wurde zunächst der RT-Mastermix aus 4 µl Quantiscript RT-Puffer, 1 µl RT-Primermix und 1 µl reverser Transkriptase hergestellt. Der Mastermix wurde auf jede Probe gegeben, sodass das Volumen der Probe nun jeweils 20 µl betrug. Die cDNA-Synthese erfolgte durch Inkubation der Proben für 15 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch Erhitzung der Proben für 3 Minuten auf 95 °C inaktiviert. Es folgte die Abkühlung der Proben auf 4 °C und die Ergänzung der Proben mit DNase freiem Wasser auf ein Probenvolumen von 30 µl, sodass eine cDNA-Konzentration von 16,67 ng/µl vorlag. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert, um sie später in der der RTD-PCR zu analysieren.

#### 3.5.4 Real Time Detection Polymerase Chain Reaction

Die Genexpression der Matrixproteine Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ I wurde mittels RTD-PCR (Real Time Detection Polymerase Chain Reaction) gemessen. Für die Genexpressionsanalyse von Kollagen Typ II und Aggrekan wurde das „TaqMan Gene Expression Assay“ von Applied Biosystems (ABI) genutzt. Für die Genexpressionsanalyse von Kollagen Typ I kam das „Quantitec Gene Expression Assay“ von Qiagen zum Einsatz. Um die Zielgenexpression relativ quantifizieren zu können und Schwankungen in der Gesamt-cDNA-Konzentration auszugleichen, wurde die Expression von Referenzgenen ermittelt, mit deren Expression die Zielgenexpression verglichen wurde. Als Referenzgen für die Zielgene Kollagen Typ II und Aggrekan wurde Beta-Actin ( $\beta$ -Actin) der Firma ABI und für das Zielgen Kollagen Typ I Beta-Actin ( $\beta$ -Actin) der Firma Qiagen eingesetzt. Je Probe wurden jeweils drei Wells einer 96-Well-PCR-Platte mit Mastermix, RNase-freiem Wasser, dem genspezifischen Primer und 1 µl cDNA (16,7 ng) versehen. Die Mengenverhältnisse variieren entsprechend der Herstellerempfehlungen (ABI und Qiagen). Die genauen Mengenverhältnisse der Ansätze sind in Tabelle 12 aufgeführt. In der Auswertung erfolgte die Mittelwertbildung der drei gleichen Proben (Triplikate) über die CT-Werte. Der CT-Wert bezeichnet den Wert der Fluoreszenz, der erstmals einen Wert über dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz anzeigt und somit den Anfang der Steigerung der Fluoreszenzintensität markiert.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes der Firmen ABI und Qiagen

	ABI	Qiagen
Mastermix	10 µl	10 µl
RNase freies Wasser	8 µl	7 µl
Primer	1 µl	2 µl
cDNA	1 µl	1 µl

Für jeden Primer wurden zusätzlich drei Wells mit allen Bestandteilen, aber ohne cDNA versehen. Diese Wells dienten als sogenannte „Blanks“ („no template control“) als Kontrollwert, um die spezifische Bindung der Primer an die cDNA zu zeigen. Das Schema der 96-Well-PCR-Platte für die RTD-PCR ist in Abbildung 22 dargestellt.

Abschließend wurde die Platte mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt, bevor die Genexpressionsanalyse im Opticon I – Real Time Cycler beginnen konnte.

Das PCR-Protokoll der Firma ABI besteht aus sechs Arbeitsschritten (Tabelle 13). Zuerst werden die Proben bei 50 °C für zwei Minuten inkubiert, um den Verdau von PCR-Produkten, die eventuell von zuvor amplifizierten Proben zurückgeblieben sind, durch die Uracil-DNA-Glykosylase zu initiieren. Im Anschluss wird die 96-Well-PCR-Platte für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt, wodurch die DNA-Polymerase aktiviert und die Uracil-DNA-Glykosylase deaktiviert wird. Nach diesen beiden ersten Schritten beginnen in den darauffolgenden Schritten die Amplifikation der cDNA sowie die Messung der Fluoreszenzsignale. Diese im Folgenden beschriebenen Schritte werden für insgesamt vierzig Zyklen wiederholt. Zunächst wird die doppelsträngige DNA 15 Sekunden lang bei 95 °C zu den zwei Einzelsträngen denaturiert. Es folgt im vierten Schritt die Anlagerung der Primer an die cDNA-Stränge (Annealing) und die Elongation der Stränge durch die DNA-Polymerase innerhalb einer Minute bei 60 °C. Im vorletzten Schritt wird in jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität jeder Probe gemessen, wobei nur diejenigen Primer fluoreszieren, die an DNA gebunden sind. Abschließend wird die Platte zur Aufbewahrung auf 4 °C heruntergekühlt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ko	<b>A</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PEI 00	<b>B</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PEI 30	<b>C</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PEI 45	<b>D</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PS 00	<b>E</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PS 30	<b>F</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
PS 45	<b>G</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			
Blank	<b>H</b>	ss BAC	ss BAC	ss BAC	ss ACAN	ss ACAN	ss ACAN	Col2	Col2	Col2			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ko	<b>A</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PEI 00	<b>B</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PEI 30	<b>C</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PEI 45	<b>D</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PS 00	<b>E</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PS 30	<b>F</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
PS 45	<b>G</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						
Blank	<b>H</b>	mBac	mBac	mBac	Col1	Col1	Col1						

**Abbildung 22:** Schemata der 96-Well-PCR-Platten für die RTD-PCR. Oben: Schema für die Genexpressionsanalyse der Gene Kollagen Typ II (Col2) und Aggrekan (ssACAN) sowie des Referenzgens  $\beta$ -Actin (ssBAC) der Firma ABI, Unten: Schema für die Genexpressionsanalyse der Gene Kollagen Typ I (Col1) sowie des Referenzgens  $\beta$ -Actin (mBAC) der Firma Qiagen.

**Tabelle 13:** PCR-Protokoll für Primer der Firma ABI

Schritt	Dauer und Temperatur	Vorgang
1	50 °C für 2 Minuten	Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase
2	95 °C für 10 Minuten	Aktivierung der DNA-Polymerase, Inaktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase
3	95 °C für 15 Sekunden	Denaturierung der cDNA
4	60 °C für 1 Minute	Anlagerung der Primer, Elongation der cDNA-Einzelstränge
5		Fluoreszenzintensitätsmessung
Wiederholen der Schritte 3 – 5 für 40 Zyklen		
6	4 °C bis Probenentnahme	Herunterkühlung der Platte zur Aufbewahrung

Das PCR-Protokoll der Firma Qiagen ist in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14:** PCR-Protokoll für Primer der Firma Qiagen

Schritt	Dauer und Temperatur	Vorgang
1	95 °C für 15 Minuten	Aktivierung der DNA-Polymerase
2	94 °C für 15 Sekunden	Denaturierung der cDNA
3	56 °C für 30 Sekunden	Anlagerung der Primer
4		Fluoreszenzintensitätsmessung
5	76 °C für 30 Sekunden	Elongation der cDNA-Einzelstränge
Wiederholen der Schritte 3 – 5 für 45 Zyklen		
6	4 °C bis Probenentnahme	Herunterkühlung der Platte zur Aufbewahrung

Zur Berechnung der relativen Genexpression der Zielgene wurde die mathematische Auswertung nach Pfaffl mittels folgender Formel angewandt <sup>[49]</sup>:

$$Ratio = \frac{Effizienz_{Zielgen}^{\Delta C_T \text{ Zielgen}}}{Effizienz_{Referenzgen}^{\Delta C_T \text{ Referenzgen}}}$$

Die Ratio beschreibt das Verhältnis der relativen Genexpression von der Kontrolle und der Probe, normalisiert in Bezug auf ein Referenzgen. Der  $\Delta C_T$ -Wert berechnet sich aus der Differenz der  $C_T$ -Werte für das Zielgen bzw. Referenzgen der Kontrollprobe und aus der Differenz der  $C_T$ -Werte für das Zielgen bzw. Referenzgen der Probe. Die Effizienzbestimmungen der verwendeten Primer für die Ziel- und Referenzgene wurden im Vorfeld von der Arbeitsgruppe ermittelt und zur Verfügung gestellt. Die Effizienzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15:** Primereffizienzen

Primer	Effizienz
Humanes Col2A1	2,06
Sus Scrofa ACAN	1,88
Sus Scrofa ACTB	1,86
Maus ACTB	1,85
Humanes COL1A1	1,96

### 3.6 Statistische Analysen

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Alle Werte sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden durch Anwendung des gepaarten Student-t-Tests analysiert oder wie in den Legenden der einzelnen Graphiken angegeben. Die Gaußsche Normalverteilung der Parameter, als Voraussetzung für den Student-t-Test, wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Der F-Test diente zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen bei nicht-normalisierten Daten. Bei Inhomogenität der Varianzen wurden die t-Werte nach Welch korrigiert. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  galt als signifikant. Ausreißer wurden mithilfe des GRUBB-Test identifiziert. Ein Stern innerhalb des Bildes weist auf statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle hin. Die Kennzeichnung mit einem Stern entspricht einem p-Wert von 0,01 bis 0,05, mit zwei Sternen einem p-Wert von 0,001 bis 0,01 und mit drei Sternen einem p-Wert kleiner als 0,001.

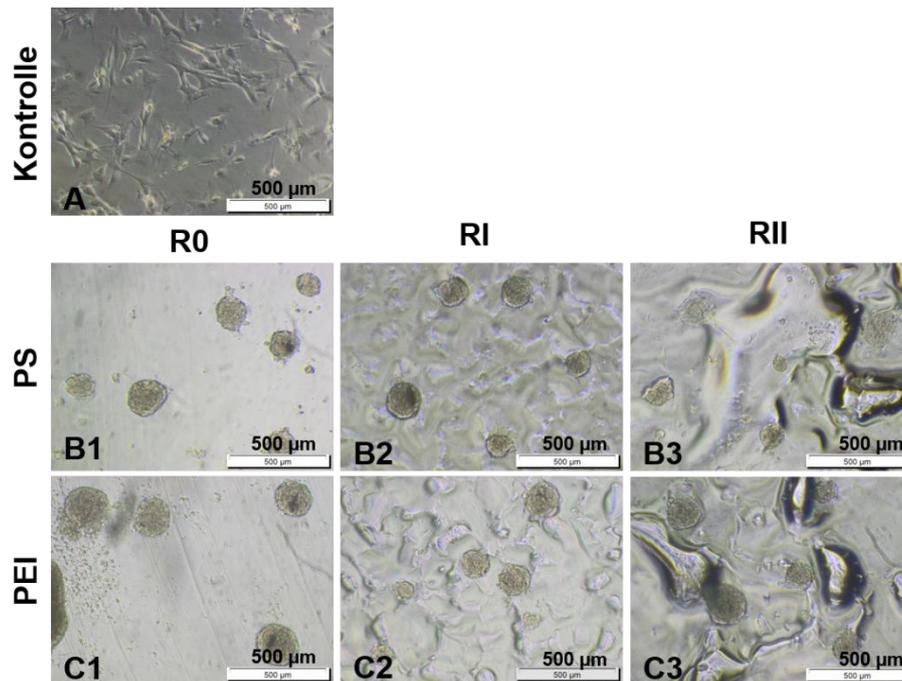
### 3.7 Richtlinien

Die experimentellen Arbeiten erfolgten nach den Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis.

## 4 Ergebnisse

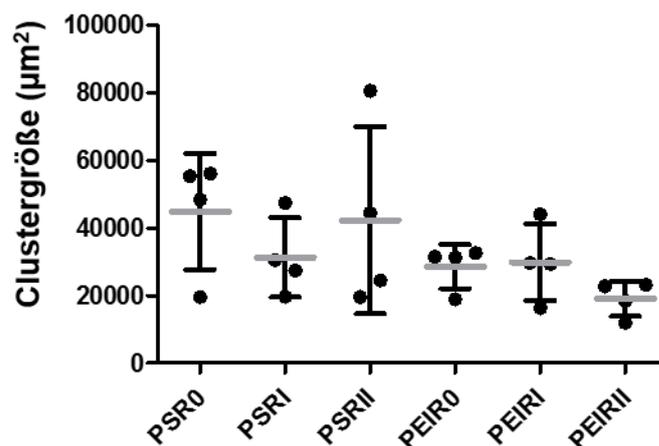
### 4.1 Effekte von PS und PEI auf die Morphologie der Chondrozyten

Porcine Gelenkchondrozyten vier verschiedener Spender wurden in den Inserts aus PS und PEI mit drei verschiedenen Rauigkeitsstufen der Oberfläche (R0, RI und RII; Tabelle 2) und als Kontrolle auf einer kommerziell erhältlichen 24-Well-Platte kultiviert. Je zwei Spender wurden 48 Stunden lang und 72 Stunden lang auf den beiden Polymeren kultiviert. Die Morphologie und Adhärenz der Chondrozyten wurde im Anschluss mithilfe des Axiovert 25 lichtmikroskopisch untersucht und fotodokumentiert. Die Chondrozyten zeigten nach der Kultivierung über 48 und 72 Stunden auf den beiden zu testenden Materialien PEI und PS in allen drei Rauigkeitsstufen eine deutliche Clusterbildung (Abbildung 23 B1-C3). Die Clustergrößen unterschieden sich dabei nicht signifikant zwischen den beiden Materialien und den verschiedenen Rauigkeitsstufen (Abbildung 24). Die Chondrozyten wiesen in den Clustern eine runde Form auf, die weitgehend einem chondrozytären Phänotyp entspricht. Auf der kommerziell erhältlichen 24-Well-Zellkultur-Kunststoffplatte aus PS mit glatter Oberfläche wuchsen die Chondrozyten gleichmäßig verteilt und hatten eine flache bis fibroblastenähnliche Form. Darüber hinaus zeigten die Chondrozyten der Kontrolle eine deutliche Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über Filopodien und Lamellopodien (Abbildung 23 A). Die Cluster auf den Materialien PS und PEI schienen weniger fest an die Zellkulturoberfläche angeheftet zu sein als die Zellen auf der Kontrolloberfläche. Diese Beobachtung konnte unter dem Lichtmikroskop bei stärkeren Bewegungen der Zellkulturplatte in verschiedene Richtungen gemacht werden, bei der sich die Cluster zwar nicht verschoben, aber teilweise mit der Bewegungsrichtung mitschwankten, während die Zellen der Kontrolle überwiegend fest an die Zellkulturoberfläche angeheftet waren. Ein Unterschied in der Anheftung zwischen den verschiedenen Rauigkeitsstufen konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 23:** Lichtmikroskopische Fotodokumentation der Chondrozyten. Fotodokumentation von Chondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung auf den Polymeren PS (B1-B3) und PEI (C1-C3) mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII). Als Kontrolle (A) diente eine kommerziell erhältliche Zellkulturplatte aus Polystyrol mit glatter Oberfläche. Pro Oberfläche ist ein repräsentatives Bild gezeigt. Alle Messbalken: 500 µm.

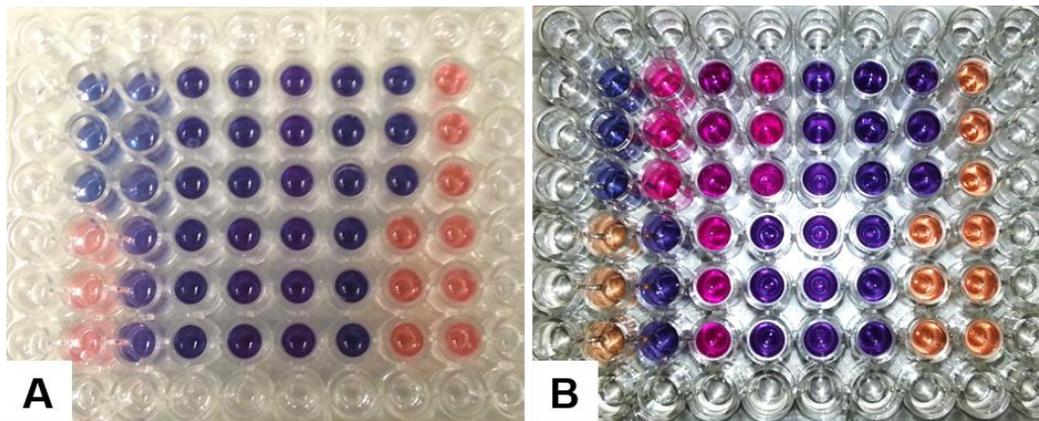
### Clustergrößen (24-Well-Inserts)



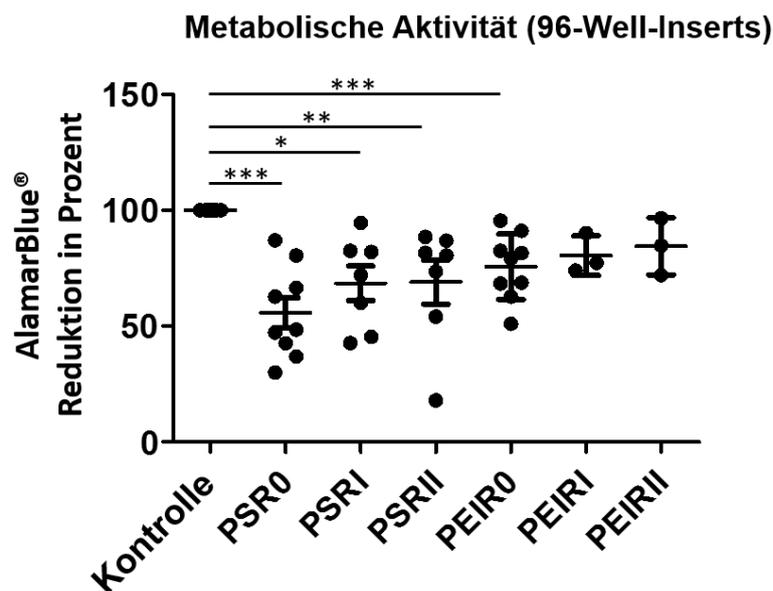
**Abbildung 24:** Clustergrößen. Größenmessung der Cluster von Chondrozyten nach Kultivierung auf den Polymeren PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII). Gemessen wurden die Clustergrößen von insgesamt vier unterschiedlichen Spendern, von denen zwei nach 48 Stunden Zellkultur und zwei nach 72 Stunden Zellkultur in jeweils drei verschiedenen Sichtfeldern pro Material und Rauigkeitsstufe gemessen wurden.

#### 4.2 Effekte von PS und PEI auf die metabolische Aktivität der Chondrozyten

Die metabolische Aktivität der porcinen Gelenkchondrozyten wurde unter Anwendung des Alamar Blue-Tests bestimmt. Insgesamt wurde die metabolische Aktivität von porcinen Gelenkchondrozyten neun verschiedener Spender getestet, die in den Inserts aus PS und PEI mit drei verschiedenen Rauigkeitsstufen der Oberfläche (R0, RI und RII; Tabelle 2) für 24 Stunden kultiviert wurden. Die Fluoreszenz der Alamar Blue-Lösung wurde stündlich über 5 – 8 Stunden und nach 24, 25 und 26 Stunden durch den Tecan SpectraFluor Microplate Reader gemessen. Bei allen Chondrozyten, die auf den zu untersuchenden Inserts und der Kontroll-Zellkulturplatte kultiviert wurden, war makroskopisch ein deutlicher Farbwechsel der Alamar Blue-Lösung von blau zu rosarot zu erkennen. Wie zu erwarten zeigte die Alamar Blue-Lösung der Negativkontrollen und der Inserts bzw. Wells ohne Zellen keinen Farbumschlag (Abbildung 25). Die Messung des Fluoreszenzwechsels ergab, dass die auf den Zellkulturinserts aus PS und PEI kultivierten Zellen verglichen mit den Zellen, die auf der kommerziell erhältlichen Zellkulturplatte aus PS kultiviert wurden, weniger metabolisch aktiv waren. Besonders signifikant war dieser Unterschied bei den jeweils glatten Oberflächen (R0). Die Unterschiede zwischen den Rauigkeitsstufen RI und RII waren nicht signifikant. Dennoch scheint eine höhere Rauigkeitsstufe der Zellkulturoberfläche mit einer leichten Erhöhung der metabolischen Aktivität der Zellen einherzugehen. Insgesamt zeigten die Zellen, die auf den PEI-Inserts kultiviert wurden, tendenziell eine höhere metabolische Aktivität als die Zellen, die auf den PS-Inserts kultiviert wurden (Abbildung 26).



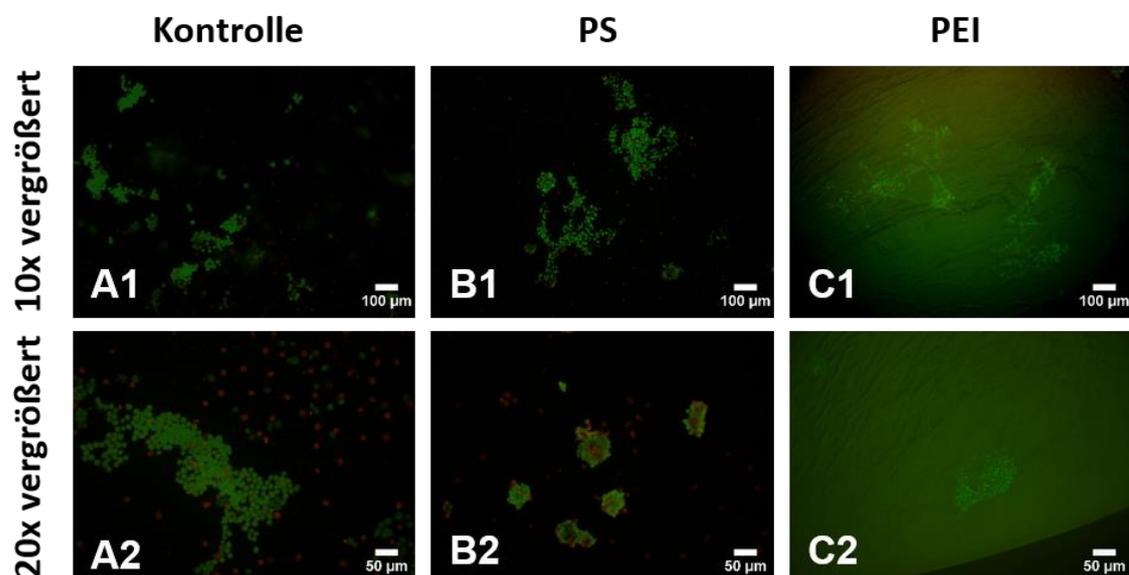
**Abbildung 25:** Farbwechsel der Alamar Blue-Lösung. Fotoaufnahmen einer 96-Well-Platte mit PS-Inserts während des Alamar Blue-Tests nach einer Zellkultur-Dauer von 0 Stunden (A) und 24 Stunden (B). Die 96-Well-Platte wurde nach dem in Abbildung 14 gezeigten Schema bestückt. Nach 24 Stunden andauernder Zellkultur zeigen alle Alamar Blue-Lösungen einen deutlichen Farbwechsel von blau zu rosa, mit Ausnahme der Negativkontrollen und der Inserts ohne Zellen.



**Abbildung 26:** Metabolische Aktivität von Chondrozyten. Die Chondrozyten wurden 24 Stunden lang auf den Polymeren PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII) kultiviert. Die Messung der metabolischen Aktivität erfolgte durch den Alamar Blue-Test. Insgesamt wurden Chondrozyten von neun verschiedenen Spendern getestet, wobei neunmal Polystyrol-Inserts mit glatter Oberfläche, siebenmal Polystyrol-Inserts mit mittelrauer und siebenmal Polystyrol-Inserts mit rauher Oberfläche sowie neunmal Polyetherimid-Inserts mit glatter Oberfläche, dreimal Polyetherimid-Inserts mit mittelrauer und siebenmal Polyetherimid-Inserts mit rauher Oberfläche verwendet wurden. Als Kontrolle diente eine kommerziell erhältliche Zellkulturplatte aus Polystyrol mit glatter Oberfläche. Die Kontrolle wurde auf 100 % normiert. \* p-Wert = 0,01 bis 0,05; \*\* p-Wert = 0,001 bis 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001.

## 4.3 Effekte von PS und PEI auf die Vitalität der Chondrozyten

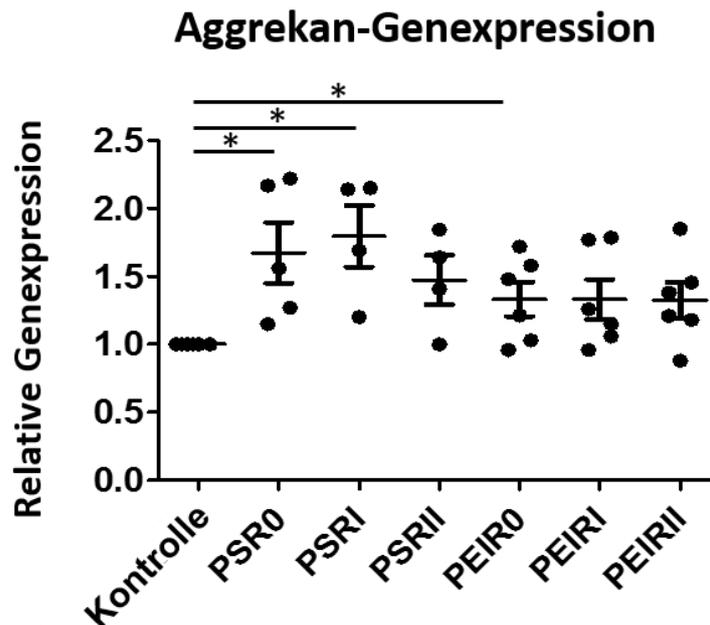
Die Vitalität der porcinen Gelenkchondrozyten wurde mithilfe der Lebend-Tot-Färbung beurteilt. Insgesamt wurden die Chondrozyten fünf unterschiedlicher Spender angefärbt. Die Inserts mit abnehmbarem Boden standen nur mit glatter Oberfläche (R0) zur Verfügung. Fünf Spender wurden auf PS kultiviert, zwei Spender auf PEI, das eine erhebliche Eigenfluoreszenz aufwies. Als Kontrolloberfläche dienten Glasplättchen, die in den Wells der kommerziell erhältlichen Zellkulturplatte aus PS platziert wurden. Die stoffwechselaktiven Zellen werden in der Lebend-Tot-Färbung grün, die toten Zellen rot angefärbt. Die Anzahl der lebenden und toten Chondrozyten, die für 48 Stunden in den Inserts aus PS und PEI sowie auf Glasplättchen kultiviert wurden, ist ähnlich hoch. Die Anzahl der lebenden Chondrozyten überwiegt bei allen Spendern und auf allen Oberflächen (Abbildung 27). Auffallend war, dass auf den Oberflächen aus PEI und PS außerhalb der Zellcluster kaum lebende Zellen zu finden waren. Dieser Effekt war auf der Oberfläche aus PS ausgeprägter als auf der Oberfläche aus PEI (Abbildung 27, B1-C1, B2-C2). Auf der Kontrolloberfläche waren überall verteilt lebende und tote Zellen sichtbar (Abbildung 27 A1, A2).



**Abbildung 27:** Lebend-Tot-Färbung der Chondrozyten. Lebend-Tot-Färbung von Chondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung auf den Polymeren PS (B1,B2) und PEI (C1,C2) mit glatter Oberfläche sowie auf einem Glasplättchen als Kontrolle (A1,A2). Die Fotos wurden in verschiedenen Sichtfeldern in 100facher (A1-C1) und 200facher (A2-C2) Vergrößerung aufgenommen. Lebende Zellen sind grün angefärbt, tote Chondrozyten erscheinen rot. Pro Oberfläche und Vergrößerung ist ein repräsentatives Bild gezeigt. Messbalken A1-C1: 100 µm; Messbalken A2-C2: 50 µm.

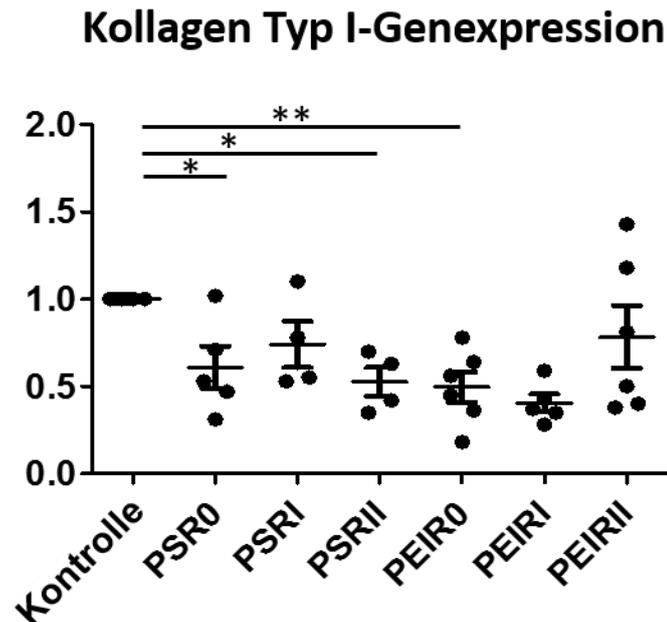
#### 4.4 Effekte von PS und PEI auf die Genexpression der Chondrozyten

Um die Differenzierung der Chondrozyten zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse mithilfe der RTD-PCR durchgeführt. Es wurden insgesamt sechs verschiedene Spender in den Inserts aus PS und PEI mit drei verschiedenen Rauigkeitsstufen der Oberfläche (R0, R1 und RII; Tabelle 2) kultiviert. Als Kontrolloberfläche dienten kommerziell erhältliche 24-Well-Zellkultur-Kunststoffplatten aus PS mit glatter Oberfläche. Die Dauer der Zellkultur betrug 48 Stunden. Untersucht wurde die relative Genexpression der gelenkknorpelspezifischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrekan als Marker für eine Differenzierung der Knorpelzellen sowie, als Marker für eine Dedifferenzierung, die relative Genexpression des gelenkknorpelunspezifischen Kollagen Typ I. Die Genexpressionsanalyse der Chondrozyten, die auf den Polymeren PS und PEI kultiviert wurden, ergab im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Expression des knorpelspezifischen Gens Aggrekan. Signifikant waren dabei die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und den Mittelwerten der glatten Oberflächen beider Materialien (PEI R0 und PS R0) sowie der mittelrauen Oberfläche des PS (PS R1) (Abbildung 28). Der Vergleich der Mittelwerte der Aggrekan-Genexpression der beiden Polymere PS und PEI ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die Chondrozyten, die auf PS kultiviert wurden, im Mittel mehr Aggrekan exprimierten (Abbildung 28).



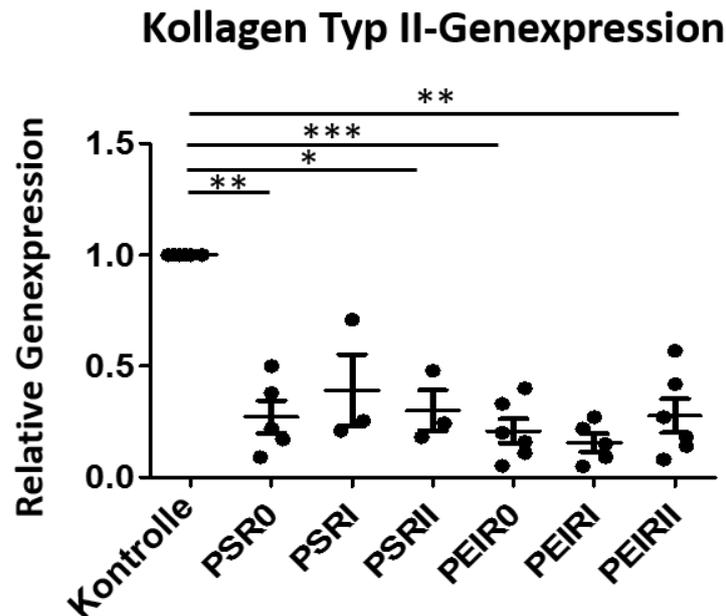
**Abbildung 28:** Relative Aggrekan-Genexpression. Relative Genexpression von Aggrekan in porcinen Gelenkchondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung auf den Polymeren PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII) sowie auf einer kommerziell erhältlichen Zellkulturplatte aus Polystyrol mit glatter Oberfläche als Kontrolle. Die Genexpression wurde durch RTD-PCR bestimmt. Die Genexpression der Kontrolle wurde auf 1,0 normalisiert. Chondrozyten von sechs unterschiedlichen Spendern wurden auf dem Polymer PEI getestet, von vier bis fünf unterschiedlichen Spendern auf dem Polymer PS. Die Testung erfolgte in unabhängigen Versuchen. \* p-Wert = 0,01 bis 0,05.

Die Genexpressionsanalyse der Gelenkknorpelzellen, die auf den Polymeren PS und PEI kultiviert wurden, zeigte im Vergleich mit der Kontrolle darüber hinaus eine niedrigere Expression des gelenkknorpelunspezifischen Gens Kollagen Typ I. Dabei waren die Unterschiede verglichen mit der Kontrolle bei der niedrigsten Rauigkeitsstufe (R0) beider Polymere und bei der höchsten Rauigkeitsstufe (RII) des PS signifikant (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Kollagen Typ I-Genexpression. Relative Genexpression von Kollagen Typ I in porcinen Gelenkchondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung auf den Polymeren PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII) sowie auf einer kommerziell erhältlichen Zellkulturplatte aus PS mit glatter Oberfläche als Kontrolle. Die Genexpression wurde durch RTD-PCR bestimmt. Die Genexpression der Kontrolle wurde auf 1,0 normalisiert. Chondrozyten von sechs unterschiedlichen Spendern wurden auf dem Polymer PEI getestet, von vier bis fünf unterschiedlichen Spendern auf dem Polymer PS. Die Testung erfolgte in unabhängigen Versuchen. \* p-Wert = 0,01 bis 0,05; \*\* p-Wert = 0,001 bis 0,01.

Aber auch die relative Genexpression des gelenkknorpelspezifischen Kollagen Typ II wurde von den Chondrozyten auf den beiden Polymeren PS und PEI im Vergleich zur Kontrolle unterdrückt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten sich bei den Rauigkeitsstufen R0 und RII beider Materialien (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Kollagen Typ II-Genexpression. Relative Genexpression von Kollagen Typ II in porcinen Gelenkchondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung auf den Polymeren PS und PEI mit den drei Rauigkeitsstufen glatt (R0), mittelrau (RI) und rau (RII) sowie auf einer kommerziell erhältlichen Zellkulturplatte aus Polystyrol mit glatter Oberfläche als Kontrolle. Die Genexpression wurde durch RTD-PCR bestimmt. Die Genexpression der Kontrolle wurde auf 1,0 normalisiert. Chondrozyten von sechs unterschiedlichen Spendern wurden auf dem Polymer PEI getestet, von drei bis fünf unterschiedlichen Spendern auf dem Polymer PS. Die Testung erfolgte in unabhängigen Versuchen. \* p-Wert = 0,01 bis 0,05; \*\* p-Wert = 0,001 bis 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001.

Die drei verschiedenen Rauigkeitsstufen beider Polymere verursachten im Genexpressionsprofil der Chondrozyten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Unterschiede der Genexpressionsprofile der beiden Kollagen-Typen waren beim Vergleich beider Polymere untereinander nicht signifikant. Dennoch lagen die Mittelwerte der relativen Genexpression der Chondrozyten, die auf der glatten (R0) und der mittelrauen (RII) Oberfläche des Polymers PEI kultiviert wurden, niedriger als die Mittelwerte der relativen Genexpression der Chondrozyten, die auf PS kultiviert wurden.

## 5 Diskussion

Chondrozyten sind der einzige Zelltyp des hyalinen Gelenkknorpels. Sie sind zuständig für die Produktion der extrazellulären Matrix, die das Knorpelgewebe so widerstandsfähig gegenüber mechanischen Einwirkungen macht [1, 2, 3, 10, 11]. Das Regenerationspotential von Knorpelgewebe ist sehr gering. Größere Defekte, die mit anderen Methoden nicht behandelt werden können, werden daher häufig durch autologe Knorpelzelltransplantation gedeckt. Für die autologe Knorpelzelltransplantation ist es notwendig, Chondrozyten aus unbelasteten Regionen des Gelenks zu entnehmen und diese *in vitro* zu expandieren, bis genügend Zellen zur Verfügung stehen, um den Defekt zu decken [26, 27, 29, 30, 31]. Dabei werden die Chondrozyten in der Regel zuerst in einem Monolayer kultiviert. Monolayer bieten die Möglichkeit, Chondrozyten schnell und relativ kostengünstig zu vermehren. Nachteilig ist, dass eine längere Kultivierung der Chondrozyten in einem Monolayer zu ihrer Dedifferenzierung, also zum Verlust des spezifischen Phänotyps der Zellen sowie zu der Änderung ihres Gen- und Expressionsprofils führt [33]. Dedifferenzierte Chondrozyten sind nicht für die Deckung eines Knorpeldefektes geeignet, da sie keine gelenkknorpelspezifischen Matrixbestandteile mehr produzieren und somit auch kein widerstandsfähiges Knorpelgewebe entstehen kann.

Bereits 1982 erkannten Benya und Shaffer in ihrer Studie das Problem der Dedifferenzierung von Chondrozyten während ihrer Kultivierung in Monolayern in Form einer herabgesetzten Kollagen Typ II-Expression [50]. Sie beobachteten aber auch, dass der differenzierte Phänotyp der Chondrozyten bei einer anschließenden Kultivierung in einer dreidimensionalen Agarose-Gel-Kultur wieder hergestellt werden konnte. Diesen Effekt nennt man Redifferenzierung. Seitdem wurden viele dreidimensionale Kulturtechniken entwickelt, die auf die gleiche Wirkung abzielen. Viele dieser Techniken beruhen auf der Nutzung von Biomaterialien, wie zum Beispiel das bereits genannte Agarose-Gel, Alginat, Kollagen oder Fibrin [11, 17, 23, 51, 52, 53, 54]. Die Kultivierung von Chondrozyten auf diesen Biomaterialien ist sehr aufwendig und teuer. Zudem ist es bei manchen Biomaterialien schwierig, die Chondrozyten im Anschluss wieder von dem Material zu lösen, wie es beispielsweise beim Agarose-Gel der Fall ist oder es kommt wieder zu einer Dedifferenzierung der Zellen, wenn sich das Biomaterial auflöst, beispielsweise zu beobachten bei der Fibrin-Kultur [11]. Die Biomaterialien können darüber hinaus das Syntheseverhalten der Chondrozyten beeinflussen, wie es bei der

Kultur in einer Kollagenmatrix in Form einer erhöhten Kollagensynthese der Fall ist <sup>[55]</sup>. Des Weiteren können Biomaterialien biochemische Analyseverfahren zur Beurteilung der Knorpelqualität behindern.

Dreidimensionale Kulturtechniken werden also schon seit vielen Jahren angewandt, um Chondrozyten für die autologe Knorpelzelltransplantation zu kultivieren <sup>[11, 17, 20, 23, 50, 53, 54, 55, 56]</sup>. Das ideale Material für die Kultivierung von Chondrozyten sollte biokompatibel sein, die Anheftung, Migration und Proliferation der Zellen erlauben und ihren differenzierten Phänotyp erhalten. Außerdem sollte das Material in verschiedenen Formen und Größen fabriziert werden können <sup>[56]</sup>. Neben der Auswahl eines geeigneten Materials hängt der Erfolg der Kultivierung differenzierter Chondrozyten aber auch von den biochemischen und mechanischen Kulturbedingungen ab. So konnte nachgewiesen werden, dass eine mechanische Beanspruchung, beispielsweise in Form zyklischen hydrostatischen Drucks <sup>[66, 67, 68, 69]</sup> und ein niedriger Sauerstoffpartialdruck <sup>[69, 70, 71]</sup> die Redifferenzierung von Chondrozyten zusätzlich stimulieren können. Auch die Wahl der Chondrozyten kann den Erfolg der Zellkultur beeinflussen. Je nach Knorpelzone weisen die Chondrozyten unterschiedliche Proteoglykan- und Kollagengehalte sowie Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften auf <sup>[5, 10, 13, 14, 15]</sup>. Diese Eigenschaften behalten die Chondrozyten selbst nach Expansion und anschließender Kultur in einem dreidimensionalen Kultursystem. Zellen der mittleren und tiefen Zone haben eine höhere Produktion an Proteoglykanen und Kollagen als die Zellen der Oberflächzone <sup>[72]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Polymere PS und PEI als Kulturoberflächen auf die Morphologie, metabolische Aktivität und das Genexpressionsprofil artikulärer Chondrozyten untersucht. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

PS ist der meist verbreitetste Kunststoff für die Herstellung von Zellkulturoberflächen. Normalerweise wird die PS-Oberfläche für die Kultivierung von Chondrozyten und anderen adhären Zellen vom Hersteller funktionalisiert (zum Beispiel durch ionisiertes Gas), da es für die Adhäsion von Zellen unbehandelt zu hydrophob ist. Kommerziell erhältliche Zellkulturflächen aus funktionalisierten PS wurden in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle verwendet. Für die Testung der Einflüsse von PS- und PEI-Zellkulturoberflächen auf die Eigenschaften von artikulären Chondrozyten wurden Inserts mit unterschiedlichen Rauigkeitsstufen speziell für 24-Well- und 96-Well-Platten durch Spritzguss angefertigt. Diese Inserts bestanden aus reinen, nicht funktionalisierten

Kunststoffen. In einer Studie von 2012 wurden Inserts, die auf die gleiche Art hergestellt wurden, immunologisch und auf mikrobielle Kontamination untersucht [44]. Da keine mikrobielle Kontamination gefunden wurde, kann man von einem sterilen Herstellungsprozess der Inserts ausgehen. Des Weiteren konnte keine immunologische Reaktion nachgewiesen werden, als die Inserts mit menschlichem Vollblut getestet wurden.

Die fehlende Funktionalisierung der Oberflächen könnte aufgrund der hohen Hydrophobie zu der licht- und fluoreszenzmikroskopisch beobachteten Clusterbildung geführt haben, die bei allen Zellkulturexperimenten auf den beiden Polymeren PS und PEI aufgetreten sind. Die hydrophobe Oberfläche erschwert nicht nur die Anheftung der Zellen, sondern verhindert auch ihre Verteilung. Dadurch proliferieren die Chondrozyten nur an den Stellen, an denen sich einige Zellen anheften konnten und bilden dort mehrere Zellschichten in Form von Zellhaufen. Dieses Phänomen ist vergleichbar mit der physiologischen Reaktion bei partiellen Gelenkknorpeldefekten. Hier steigert sich nach initialer Nekrose der Chondrozyten die mitotische und metabolische Aktivität der Chondrozyten am Defektrand und es bilden sich Zellcluster, da die Chondrozyten durch die Knorpelmatrix ortsgebunden sind [57, 58]. Kuettner et al. kultivierten Chondrozyten bewusst in mehreren Zellschichten, indem sie die Zellen in einem Monolayer in einer deutlich höheren Zelldichte aussäten als üblich ist ( $2 \times 10^5$  Chondrozyten/cm<sup>2</sup> statt  $5 \times 10^3$  bis  $16 \times 10^3$  Chondrozyten/cm<sup>2</sup>) [59]. Somit entstand ein sogenannter „Multilayer“. Die Chondrozyten synthetisierten noch nach zwei Wochen in Zellkultur Aggrekan und Kollagen Typ II. Diesen Effekt führten die Autoren auf die durch die Schichten entstandene dreidimensionale Umgebung zurück, die die Gegebenheiten *in vivo* imitiert. Leider sank die Zellzahl aber mit zunehmender Kultivierungsdauer.

Die Größe und Morphologie der Zellcluster ist ein indirektes Zeichen für das Zellwachstum und die Synthese von extrazellulärer Matrix. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien und Rauigkeitsstufen gefunden werden.

Neben der Clusterbildung fiel im Unterschied zu den Chondrozyten auf der Kontrolloberfläche auch eine niedrigere metabolische Aktivität der Chondrozyten auf, die auf den beiden Polymeren PS und PEI kultiviert wurden. Auch dieser Effekt könnte an der fehlenden Funktionalisierung der beiden zu testenden Kunststoffe und der damit verbundenen erschwerten Adhäsion der Chondrozyten liegen. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede in den Werten gefunden werden konnten, konnte von den

Zellen, die auf PEI kultiviert wurden, im Vergleich zu denjenigen, die auf PS kultiviert wurden, eine höhere metabolische Aktivität gemessen werden. Auch die Rauigkeitsstufe der Oberfläche schien einen Einfluss auf die metabolische Aktivität zu haben. So stieg die metabolische Aktivität mit Zunahme der Rauigkeit, also mit zunehmend dreidimensionaler Umgebung, leicht an. Auch diese Werte waren allerdings nicht signifikant. Einen vergleichbaren Effekt beobachteten Balasundaram et al. 2014 bei der Kultivierung von Chondrozyten auf den Polymeren Polyurethan und Polycaprolacton, deren Oberfläche im Nanometerbereich angeraut worden war <sup>[73]</sup>. Die Zellzahl sowie die intrazelluläre Synthese von Proteinen und die Kollagensekretion der Chondrozyten stiegen im Vergleich zur glatten Kontrolloberfläche signifikant an.

Dass die Mehrzahl aller Zellen, unabhängig von der Zellkulturoberfläche, vital war, zeigte der Vergleich der Lebend-Tot-Färbungen der Chondrozyten nach 48-stündiger Kultivierung. Insgesamt konnte hinsichtlich der Zellvitalität kein größerer Unterschied zwischen den beiden Testmaterialien und der Kontrolle gefunden werden, mit Ausnahme von der Beobachtung, dass auf PS die Mehrzahl der Zellen, die außerhalb der Zellcluster lagen, tot war. Die Zellen in Clustern blieben größtenteils vital. Die Zellen außerhalb der Cluster haben keine Zell-Zell-Kontakte ausgebildet, was vermutlich ebenfalls auf die fehlende Funktionalisierung der Oberfläche zurückgeführt werden kann. Man könnte also vermuten, dass Chondrozyten, die keine Zell-Zell-Kontakte ausbilden können, eher zum Zelltod neigen. Die Zellen in den Clustern nahmen eine runde Form an, die weitgehend einem chondrozytären Phänotyp entspricht. So könnten die Zellen zur Ausbildung kortikaler Aktin-Netzwerke und multipler Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Cluster angeregt worden sein <sup>[65]</sup>. Das Zytoskelett der Chondrozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kultivierung von Chondrozyten in der vorliegenden Arbeit, waren Mäusefibroblasten der Linie L929 <sup>[60]</sup> und mesenchymale Stammzellen der Maus <sup>[61]</sup> fähig, auf der Oberfläche der PEI-Inserts zu adhären. Ein Wachstum in Zellclustern war nicht zu beobachten. Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten dafür sprechen, dass diese Zellen weniger abhängig von den physikalischen Eigenschaften der Zellkulturoberfläche sind als Chondrozyten aufgrund der unterschiedlichen Oberflächen-Rezeptor-Profile. Auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Anheften und das Wachstum verschiedener Zelltypen auf Zellkulturoberflächen aus PEI möglich sind <sup>[39, 61, 62]</sup>. 2012 wurde in einer

Arbeit von Schneider et al. beobachtet, dass sich artikuläre Chondrozyten an gebündelte und ungeordnete elektogespinnene PEI-Fasern anlagern können <sup>[63]</sup>.

Die beiden höheren Rauigkeitsstufen der Zellkultur-Inserts erzeugten eine Oberflächenvergrößerung und imitierten zudem die dreidimensionale natürliche Umgebung der Chondrozyten im Kniegelenk. Glatte Zellkulturoberflächen können, wie bereits erwähnt, eine Dedifferenzierung der Chondrozyten induzieren und zudem die Ausbildung von Stressfasern begünstigen <sup>[64, 65]</sup>. Der zytoskeletale Aufbau der Chondrozyten steht in einem engen Zusammenhang mit ihrem Genexpressionsprofil <sup>[64]</sup>. Die Anordnung der Chondrozyten in Zellclustern auf den beiden Polymeren PS und PEI hat die Ausbildung ihrer phänotypischen runden Form verstärkt. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroporen der Polymere mit den Rauigkeitsstufen mittelrau (RI) und rau (RII) aber in ihrer Tiefe und Breite irregulär waren (Tabelle 2), ist nicht klar, welche Porengröße und -form am besten für die Zellkultur artikulärer Chondrozyten geeignet wäre, um zu der beobachteten Ausbildung einer stabilen phänotypischen Form der Chondrozyten zu führen. Zu beachten ist, dass sich die Rauigkeitsstufen RI und RII aufgrund der Materialeigenschaften und der Herstellungsschritte leicht zwischen den beiden Materialien PS und PEI unterscheiden (Tabelle 2).

Die Genexpressionsanalyse der Chondrozyten wurde mithilfe der RTD-PCR durchgeführt. Die Analyse ergab eine Erhöhung der Aggrekansynthese und eine herabgesetzte Synthese der beiden getesteten Kollagen-Typen (Kollagen Typ I und Kollagen Typ II) im Vergleich zur Kontrolle. Aggrekan ist ein gelenkknorpelspezifischer Marker. Die Erhöhung spricht daher für die Differenzierung der Knorpelzellen, die auf den Materialien PS und PEI kultiviert wurden. Auch die herabgesetzte Synthese des knorpelunspezifischen Kollagen Typ I stützt diese Annahme. Auf der anderen Seite ist eine herabgesetzte Kollagen Typ II-Synthese normalerweise mit einer Dedifferenzierung von Chondrozyten assoziiert <sup>[33]</sup>. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Genexpressionsprofil der Chondrozyten, die auf PS und PEI kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten dadurch eingeschränkt worden sein, dass die Chondrozyten vor der Aussaat in die zu untersuchenden Inserte zwei bis drei Passagen lang in kommerziell erhältlichen Zellkulturflaschen aus funktionalisiertem PS expandiert wurden. Es standen keine Zellkulturflaschen aus PEI oder nicht funktionalisiertem PS zur Verfügung.

Die Kunststoffinserts aus PEI besaßen eine gelbliche Farbe (Abbildung 12), die einige unspezifische Fluoreszenzsignale erzeugte, wodurch die Messung der Fluoreszenzsignale im Rahmen des Alamar Blue-Tests oder die Beurteilung der Zellen bei der Lebend-Tot-Färbung beeinflusst worden sein könnte. Zuletzt könnte die weniger starke Adhäsion der Zellcluster an die Zellkulturoberflächen aus PEI und PS zu einem Verlust an Zellen während der Spülschritte mit PBS geführt haben.

## 6 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass sowohl die Art des Kunststoffes (PEI oder PS) also auch seine Oberflächenbeschaffenheit Einfluss auf die Morphologie, die metabolische Aktivität und das Expressionsprofil artikulärer Chondrozyten haben.

Die erhöhte Aggrekan-Genexpression lässt vermuten, dass die Bildung von Zellclustern, die auf beiden zu testenden Materialien beobachtet wurde, durch die Erzeugung einer dreidimensionalen Umgebung die gelenkknorpelspezifische Genexpression der Chondrozyten unterstützt haben könnte. PEI scheint für die Kultivierung artikulärer Chondrozyten etwas geeigneter zu sein, da es im Vergleich zu PS eine etwas höhere metabolische Aktivität der Chondrozyten induziert hat.

Zukünftig sollten Zellkulturoberflächen aus PEI beispielsweise durch Hydrophilisation funktionalisiert werden und erneut als Kulturoberfläche für artikuläre Chondrozyten getestet werden. Die Funktionalisierung könnte zu einer besseren Adhärenz der Chondrozyten und somit zu einer stärkeren Ausprägung der positiven Effekte auf die knorpelspezifische Genexpression führen. Außerdem würde somit das Risiko sinken, einen Teil der Zellen während der Spülschritte, die Teil der Zellkultur aber auch einiger Analyseverfahren sind, zu verlieren. Neben dem Trägermaterial sind aber auch die biochemischen und mechanischen Kulturbedingungen sowie die Herkunft der Chondrozyten entscheidend für den Erfolg der Knorpelzellkultivierung. In weiteren Versuchen könnten also die Kulturbedingungen, die in anderen Arbeiten als positive Stimuli für die Redifferenzierung der Knorpelzellen beschrieben wurden, auch während der Zellkultur auf PEI eingesetzt werden, um die Proliferation differenzierter Chondrozyten zu unterstützen. Zudem könnte man erwägen, vor allem Zellen aus der mittleren und tiefen Zone des Gelenkknorpels für die Kultivierung zu nutzen, um eine höhere Synthese an Proteoglykanen und Kollagen Typ II hervorzurufen <sup>[72]</sup>.

Die Vorteile einer erfolgreichen Kultivierung differenzierter artikulärer Chondrozyten auf einem Kunststoff, beispielsweise aus PEI, lägen in der kostengünstigen sowie ökonomisch und technisch einfachen Alternative zu den teuren und aufwendigen 3D-Kulturtechniken, die zurzeit für die Knorpelzellkultivierung gängig sind. Ideal wäre die Kombination der hohen Proliferationsrate, wie sie in kommerziell erhältlichen Monolayern beobachtet werden kann, mit der Erhaltung des chondrozytären Phänotyps. Eine reine

Zell-Matrix-Kultur ohne die Einbindung von Fremdstoffen würde auch biochemische Analyseverfahren zur Beurteilung der Knorpelqualität erleichtern.

Die maßangefertigten Zellkulturinserts für 24- und 96-Well-Platten haben eine Untersuchung der Chondrozyten ermöglicht, ohne dass sie Kontakt mit der umgebenen Multiwell-Platte hatten. Somit konnten die nachgewiesenen Effekte eindeutig auf das zu testende Material und nicht etwa auf eine Mischung der Effekte des Test- und Kontrollmaterials zurückgeführt werden. Außerdem konnten durch das einfache Einsetzen und Herausnehmen der Inserts mehrere Kunststoffe und Rauigkeitsstufen gleichzeitig auf einer Multiwell-Platte getestet werden. Dadurch konnten Zeit und Material gespart werden.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ABI	Applied Biosystems
AG	Arbeitsgemeinschaft
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CH	Schweiz
C <sub>T</sub>	<i>Cycle threshold</i>
DE	Deutschland
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ES	Spanien
EtBr	Ethidiumbromid
FDA	Fluoresceindiacetat
FKS	Fetales Kälberserum
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
ID	<i>Identification</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyetherimid
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure (engl.)
RTD	<i>Real-Time Detected</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulphate</i>
TCP	<i>Tissue Culture Plastic</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Ulfig N: Kurzlehrbuch Histologie. 2010, Georg Thieme Verlag; 3:41-44
- 2 Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 2013, Springer Verlag; 9.1:180-89
- 3 Marlovits S, Vécsei V: Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten – Teil 1: Grundlagen der Knorpelbiologie und der Heilung von Knorpeldefekten. 2000, Acta Chir Austriaca 32(3):124-29
- 4 Maletius W, Aigner T: Morphologie und Molekularpathologie der Osteoarthrose: Relevanz für Pathogenese und Diagnostik. 1999, Arthroskopie 12(1):3-8
- 5 Martinek V: Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. 2003, Dtsch Z Sportmed 54(6):166-70
- 6 Watanabe H, Yamada Y, Kimata K: Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function. 1998, J Biochem 124(4):687-93
- 7 Nehrer S: Orthopädisch-chirurgische Therapie des Gelenkknorpeldefektes. 2015, rheuma plus 14(3):82-87
- 8 Archer CW, Francis-West P: Cells in focus: The chondrocyte. 2003, Int J Biochem Cell Biol 35:401-04
- 9 Huch K, Stöve J, Puhl W, Günther KP: Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. 2002, Z Orthop 140:154-52
- 10 Benz K, Mollenhauer J: Gelenkknorpel, Arthrose und zelluläre Reparatur. 2007, Trauma Berufskrankh 9:235-41
- 11 Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH: The Chondrocyte: Biology and Clinical Application. 2006, Tissue Eng 12(7):1971-84
- 12 Pullig O, Pfandder D, Swoboda B: Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und –progression. 2001, Orthopäde 30:825-33

- 13 Grad S, Salzmann GM: Chondrozyten: ein Zelltyp, verschiedene Subpopulationen. 2009, Orthopäde 38:1038-44
- 14 Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi MD, Laverts S: Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. 2001, Clin Orthop Relat Res 391:26-33
- 15 Söder S, Aigner T: Arthrose: Ätiologie, Typisierung, Stadieneinteilung und histologische Graduierung. 2011, Pathologe 32:183-92
- 16 Krackhardt T, Weise K: Klinische Erfahrungen mit der Knorpelzelltransplantation. 2002, Trauma Berufskrankh 4:104-09
- 17 Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B: Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur: Einfluss von intermittierendem hydrostatischen Druck und niedrigem Sauerstoffpartialdruck. 2000, Orthopäde 29:91-99
- 18 Krettek C, Jagodzinski M, Zeichen J: Knorpelzelltransplantation – Eine Alternative zur Endoprothese?. 2005, Chirurg 76:467-73
- 19 Rabenberg M: Arthrose: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2013, Heft 54
- 20 Marlovits S, Truppe M, Grasslober M, Tichy B, Dezfulian M, Naeimi Z, Trummer S, Presslauer S, Vécsei V: Biologische Eigenschaften humaner artikulärer Chondrozyten in Zellkultur und der Einfluss auf die autologe Chondrozytentransplantation. 2000, Acta Chir Austriaca, 32(161):129-30
- 21 Mainil-Varlet P, Fischer R, Jülke H, Aigner T: Spontaner und posttherapeutischer Knorpelrepair: Bewertungskriterien. 2006, Pathologe 27:461-68
- 22 Bös L, Ellerman A: Arthroskopische Diagnostik und Klassifikation von Knorpelschäden. 2003, Dtsch Z Sportmed 6:181-83
- 23 Marlovits S, Nürnberger S, Kolonja A, Singer P, Zeller P, Mandl I, Vécsei V: Matrixgekoppelte autologe Knorpelzelltransplantation: Biomaterialien als

- Trägersubstanzen/Biologische Eigenschaften. 2004, Trauma Berufskrankh 4:314-23
- 24 Braun S, Vogt S, Imhoff AB: Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. 2007, Orthopäde 36:589-600
- 25 Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. 2002, Osteoarthritis Cartilage 10(6):432-63
- 26 Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isakson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. 1994, New Eng J Med 331(14):889-95
- 27 Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Peterson L: Rabbit articular defects treated with autologous cultured chondrocytes. 1996, Clin Orthop Relat Res 326:270-83
- 28 Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A: treatment of osteochondritis dissecans off he knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. 2003, j Bone Joint Surg Am 85-A(2):17-24
- 29 Behrens P, Bosch U, Bruns J: Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). 2004, Z Orthop Unfall 142(5): 529-39
- 30 Schewe B, Fritz J, Gaissmaier C, Weise K: Knorpelzelltransplantation: Operationstechnik mit matrixassoziierten Chondrozyten. 2006, Unfallchirurg 109:577-82
- 31 Müller JE: Technik und Ergebnisse der autologen Knorpelzelltransplantation. 2001, Trauma Berufskrankh 3:370-74
- 32 Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P: Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. 2006, Adv Drug Deliv Rev 58(2):3300-22

- 33 Schulze-Tanzil G: Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. 2009, *Ann Anat* 191:325-38
- 34 Braune S, Lange M, Richau K, Lutzow K, Weigel T, Jung F, Lendlein A: Interaction of thrombocytes with poly(ether imide): The influence of processing. 2010, *Clin Hemorheol Micro* 46:239-50
- 35 Wagner E: Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: will "artificial viruses" be the answer?. 2004, *Pharm Res* 21(1):8-14
- 36 Kim SB, Jo JH, Lee SM, Kim HE, Shin KH, Koh YH: Use of a poly(ether imide) coating to improve corrosion resistance and biocompatibility of magnesium (Mg) implant for orthopedic applications. 2013, *J Biomed Mater Res A* 101(6):1708-15
- 37 Lange M, Braune S, Luetzow K, Richau K, Scharnagl N, Weinhart M, Neffe AT, Jung F, Haag R, Lendlein A: Surface functionalization of poly(ether imide) membranes with linear, methylated oligoglycerols for reducing thrombogenicity. 2012, *Macromol Rapid Commun* 33(17):1487-92
- 38 Neffe AT, Lendlein A: Tailoring established polymers for medical applications. 2007, *Med Device Technol* 18(6):14-19
- 39 Li R, Wang X, Ji Z, Sun B, Zhang H, Chang CH, Lin S, Meng H, Liao YP, Wang M, Li Z, Hwang AA, Song TB, Xu R, Yang Y, Zink JI, Nel AE, Xia T: Surface charge and cellular processing of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes determine pulmonary toxicity. 2013, *ACS nano* 7(3):2352-68
- 40 Schneider T, Kohl B, Sauter T, Kratz K, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G: Influence of fiber orientation in electrospun polymer scaffolds on viability, adhesion and differentiation of articular chondrocytes. 2012, *Clin Hemorheol Micro* 52:325-36
- 41 Boyan BD, Lincks J, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Blanchard CR, Dean DD, Schwartz Z: Effect of surface roughness and composition on costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state. 1999, *J Orthop Res* 17(3):446-57

- 42 Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD: Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. 1996, J Biomed Mater Res 30(2):145-55
- 43 Callister WD, Rethwisch DG: Materials Science and Engineering. 2013, Wiley-VCH Verlag; 9
- 44 Roch T, Kruger A, Kratz K, Ma N, Jung F, Lendlein A: Immunological evaluation of polystyrene and poly(ether imide) cell culture inserts with different roughness. 2012, Clin Hemorheol Micro 52:375-89
- 45 DIN 16747: 1981-05. Roughness of the moulding surfaces of compression moulds and injection moulds.
- 46 Hiebl B, Lützow K, Lange M, Jung F, Seifert B, Klein F, Weigel T, Kratz K, Lendlein A: Cytocompatibility testing of cell culture modules fabricated from specific candidate biomaterials using injection molding. 2010, J Biotechnol 148:76-82
- 47 Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R: The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. 2007, Hum Reprod 22(5):1304-09
- 48 Haugland RP, MacCoubrey IC, Moore PL: Dual-fluorescence cell viability assay using ethidium homodimer and calcein AM. 1994, US 5314805 A
- 49 Pfaffl MW: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 2004, BIOSpektrum 1:92-95
- 50 Benya PD, Shaffer JD: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. 1982, Cell 30(1):215-24
- 51 Aulthouse AL: Expression of the human chondrocyte phenotype *in vitro*. 1989, In Vitro Cell Dev Biol 25(7):659-68
- 52 Quinn TM, Schmid P, Hunziker EB, Grodzinsky AJ: Proteoglycan deposition around chondrocytes in agarose culture: construction of a physical and

- biological interface for mechanotransduction in cartilage. 2002, *Biorheology* 39(1-2):27-37
- 53 Homicz MR: Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. 2003, *Laryngoscope* 113(1):25-32
- 54 Perka C: Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. 2000, *Clin Exp Rheumatol* 18(1):13-22
- 55 Grande DA, Halberstadt C, Noughton G, Schwartz R, Manji R: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. 1997, *J Biomed Mater Res* 34(2):211-20
- 56 Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH: An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. 2001, *Ann Acad Med Singapore* 30(2):183-91
- 57 Aigner T, Kim AH: Apoptosis and cellular vitality: Issues in osteoarthritic cartilage degeneration. 2002, *Arthritis Rheum* 46(8):1986-96
- 58 Kuhn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz MK: Cell death in cartilage. 2004, *Osteoarthritis Cartilage* 12(1):1-16
- 59 Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. 1982, *J Cell Biol.* 93(3):743-50
- 60 Hiebl B, Lutzow K, Lange M, Jung F, Seifert B, Klein F, Weigel T, Kratz K, Lendlein A: Cytocompatibility testing of cell culture modules fabricated from specific candidate biomaterials using injection molding. 2010; *J Biotechnol* 148:76–82
- 61 Xu X, Kratz K, Wang W, Li Z, Roch T, Jung F, Lendlein A, Ma N: Cultivation and spontaneous differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells on polymeric surfaces. 2013; *Clin Hemorheol Microcirc* 55(1):143-56

- 62 Seifert B, Mihanetzis G, Groth T, Albrecht W, Richau K, Missirlis Y, Paul D, von Sengbusch G: Polyetherimide: A new membrane-forming polymer for biomedical applications. 2002, *Artif Organs* 26(2):189-99
- 63 Schneider T, Kohl B, Sauter T, Kratz K, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G: Influence of fiber orientation in electrospun polymer scaffolds on viability, adhesion and differentiation of articular chondrocytes. 2012, *Clin Hemorheol Micro* 52:325-36
- 64 Haudenschild DR, Chen J, Steklov N, Lotz MK, D'Lima DD: Characterization of the chondrocyte actin cytoskeleton in living three-dimensional culture: Response to anabolic and catabolic stimuli. 2009; *Mol Cell Biomech* 6(3):135-44
- 65 Park EH, Kang SS, Lee YS, Kim SJ, Jin EJ, Tak EN, Sonn JK: Integrity of the cortical actin ring is required for activation of the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways in redifferentiation of chondrocytes on chitosan. 2008, *Cell Biol Int* 32(10):1272-78
- 66 Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B: Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated *in vitro*. 2003; *J Orthop Res* 21(3):451-57
- 67 Larsson T, Aspden RM, Heinegard D: Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis *in vitro*. 1991, *Matrix* 11(6):388-94
- 68 Parkkinen JJ, Lammi MJ, Helminen HJ, Tammi M: Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression *in vitro*. 1992; *J Orthop Res* 10(5):610-20
- 69 Bassett CAL, Herrmann I: Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues *in vitro*. 1982, *Nature* 190: 460-61
- 70 Hunter SJ, Caplan AI: Control of cartilage differentiation. In: Hall BM *Cartilage* Vol. 2: Development, differentiation and growth. 1983; Academic Press, New York; 87-120

- 71 Pawelek JM: Effects of thyroxine and low oxygen tension on chondrogenic expression in cell culture. 1969, Dev Biol 19(1):52-72
- 72 HU JC, Athanasiou KA: Chondrocytes from different zones exhibit characteristic differences in high density culture. 2006; Connect Tissue Res 47(3):133-40
- 73 Balasundaram G, Storey DM, Webster TJ: Novel nano-rough polymers for cartilage tissue engineering. 2014, Int J Nanomedicine 9:1845-53

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Josephine König, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*„Effekte von Polystyrol- und Polyetherimid-Zellkulturinserts mit verschiedenen Rauigkeitsstufen auf die Morphologie, die metabolische Aktivität und das Expressionsprofil artikulärer Chondrozyten“*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Josephine König hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

*König J, Kohl B, Kratz K, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G: Effect of polystyrene and polyether imide cell culture inserts with different roughness on chondrocyte metabolic activity and gene expression profiles of aggrecan and collagen. 2013; Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol. 55, no. 4, pp. 523-533.*

Frau König hat im Einzelnen sowohl die Ergebnisse mit den Zellkulturen für das Manuskript erarbeitet als auch bei Erstellen und Korrektur der Arbeit mitgewirkt. Damit hat sie mit ca. 60% für die gesamte Arbeit ihren Beitrag geleistet.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationsliste

### Publikationen:

König J, Kohl B, Kratz K, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G: Effect of polystyrene and polyether imide cell culture inserts with different roughness on chondrocyte metabolic activity and gene expression profiles of aggrecan and collagen. 2013; Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol. 55, no. 4, pp. 523-533

### Posterbeiträge:

König J, Kohl B, Kratz K, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G: Effect of polystyrene and polyether imide cell culture inserts with different roughness on chondrocyte metabolic activity and gene expression profile. Posterbeitrag zur 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Mai 2013.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Frau PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Dissertation. Ich konnte mich jederzeit mit allen Fragen zu dieser Arbeit an sie wenden und erhielt stets hilfreiche Lösungen und Ratschläge. Ich bedanke mich für Ihre außerordentliche Geduld, Ihre Sorgfalt und motivierenden Worte.

Ebenso möchte ich mich bei Benjamin Kohl für die zahlreichen Hilfestellungen und Problemlösungen im Laboralltag bedanken.

Auch möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgemeinschaft für die freundliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ich habe jederzeit gerne in diesem Team gearbeitet.

Ein herzlicher Dank geht ebenfalls an meine Familie für die Unterstützung.