

Der Einfluß von *TGF-β1* auf das Wachstum und die  
Differenzierung von humanen Gelenkchondrozyten im  
zwei- und dreidimensionalen Zellkulturmodell.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lars Walz  
aus Hanau

Gießen 2006

Aus dem Institut für Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: Herr Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Frau PD Dr. M. Wimmer-Röll

Tag der Disputation: 23.02.2007



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>07</b>
1.1	Darstellung der Thematik	07
1.2	Hyaliner Knorpel	08
1.2.1	Eigenschaften und Funktion	08
1.2.2	Chondrozyten	09
1.2.3	Knorpelgrundsubstanz	10
1.2.4	Knorpelstoffwechsel	11
1.2.5	Struktureller Aufbau	13
1.3	Arthrose	14
1.4	Transforming Growth Factor $\beta$ ( <i>TGF-<math>\beta</math></i> )	15
1.5	Core Binding Factor A1 ( <i>Cbfa1</i> )	18
1.5.1	Struktur und Funktion der <i>Cbfa1</i> -Einheit	19
1.6	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase ( <i>HPRT</i> )	20
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Probenmaterial	23
3.1.1	Knorpelgewinnung	23
3.1.2	Isolierung von Chondrozyten aus Knorpelgewebe	23
3.2	Zellzählung	25
3.2.1	Elektronische Zellzählung	25
3.2.2	MTT-Test	26
3.3	Kultivierung der Chondrozyten	27
3.3.1	Kulturmedium	27
3.3.2	<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	27
3.3.3	Im Monolayer	28
3.3.4	Im Alginat	29
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.4.1	Prinzip	33

3.4.2	Isolierung und Aufreinigung von RNA	35
3.4.3	Reverse Transkription	35
3.5	Quantitative Real-Time-PCR	37
3.5.1	Einführung	37
3.5.2	Berechnung der $\Delta$ CT Werte	39
3.5.3	Durchführung der qrt-PCR	40
3.6	Gelelektrophoretische Größenfraktionierung der amplifizierten DNA	42
3.7	Statistische Auswertung der Ergebnisse	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1	Proliferationsversuche	44
4.2	Monolayerpassagen mit Messung der <i>Cbfa1</i> Expression	46
4.3	Messung der <i>Cbfa1</i> Expression über 3 Passagen in Alginat	47
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1	<i>TGF<math>\beta</math>-1</i>	52
5.2	<i>Cbfa1</i>	54
5.3	Kultivierungssystem	55
5.4	Allgemeine Diskussion der Ergebnisse	57
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Materialliste</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Datentabellen</b>	<b>83</b>
10.1	Proliferationsversuche	83
10.2	Messung der <i>Cbfa1</i> Expression in Monolayerpassagen	84
10.3	Messung der <i>Cbfa1</i> Expression in Alginatkulturen	85

<b>11</b>	<b>Erklärung</b>	<b>93</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>95</b>
<b>14</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>96</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Darstellung der Thematik

Da derzeit in der orthopädischen Chirurgie die Behandlung von Knorpeldefekten, vermehrt an Hüfte und Knie, einen immer größeren Stellenwert einnimmt, wird eine Vielzahl von Therapiemöglichkeiten angeboten. Sie alle haben primär zum Ziel, beim Patienten Schmerzen und Entzündungen zu reduzieren und seine Bewegungsfähigkeit wieder herzustellen.

Als orthopädisch-chirurgische-Verfahren werden meist angewandt:

Das Shaving, bei dem die defekte aufgerauhte Knorpeloberfläche abgetragen wird. Die Microfrakturierung, bei der der Knorpel quasi durchlöchert wird, um Platz für neu einsprossendes Material zu schaffen.

Das Einsetzen von gesamten Knorpelstanzzyllindern, die autologe osteochondrale Transplantation (OCT) (Werner und Arnold, 2003), um wieder eine direkt belastbare Fläche zu schaffen.

Besonderes Augenmerk richtet sich aber zunehmend auf die sogenannte autologe Chondrozyten Transplantation (ACT). Die Idee für diese Technik besteht darin, daß dem Patienten Knorpelzellen entnommen, im Labor vermehrt und ihm schließlich zur Defektdeckung wieder reimplantiert werden. Als Vorreiter in diesem Bereich sind *Brittberg, Peterson et al.* (1993, 1994, 1995) zu nennen, die die autologe Chondrozytentransplantation bis heute mit Erfolg durchführen. Hierbei werden in einem ersten operativen Eingriff dem Patienten aus einem „intakten“ Areal Knorpelstücke entnommen, die Chondrozyten herausgelöst und anschließend in Monolayer-Kulturen vermehrt. In einer zweiten Operation wird die defekte Stelle mit einem autologen Periostlappen, der angenäht wird, bedeckt und darunter die Zellsuspension injiziert. Zur vollständigen Versiegelung werden die Ränder des Periostlappens mit Fibrinkleber verklebt. Nach aktuellen Studien (Peterson et al., 2002) entspricht das Gewebe optisch und in seinen biomechanischen Eigenschaften

weitgehend dem eines hyalinen Knorpels. Allerdings ist immer noch von einer Defektheilung, die histomorphologisch am ehesten einem Faserknorpel entspricht, auszugehen.

Aufbauend auf diesem Basisprinzip ist man mittlerweile dazu übergegangen mit unterschiedlichsten Materialien wie einem Kollagengel (Schneider und Gavénis, 2003), einer Kollagenmatrix MACI (Behrens et al., 2000, Bashad et al., 2003) oder mit einem Polymervlies (Rudert et al., 2003) zu arbeiten, um dem Knorpel ein möglichst dreidimensionales Wachstum zu ermöglichen. D.h., es wird versucht, den Chondrozyten ein Gerüst zu bieten, in dem sie sich wie im hyalinen Knorpel räumlich und in der für sie typischen Weise anordnen können.

Inzwischen führt man Versuche mit mesenchymalen Stammzellen durch, um diese unter Zugabe von verschiedensten Faktoren dahingehend zu beeinflussen, sich in Richtung der chondroblastären Linie zu differenzieren (Richter et al., 2002 ; Nöth et al. 2003, Hendrich et al., 2003).

Alle diese Verfahren, die auf der Chondrozytentransplantation aufbauen, werden auch unter dem Begriff des „Tissue Engineering“ zusammengefaßt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind bereits vielversprechende Ergebnisse aufzuweisen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit diesem Forschungsgebiet.

## **1.2 Hyaliner Knorpel**

### **1.2.1 Eigenschaften und Funktion**

Der hyaline Knorpel ist die häufigste Knorpelart, die in unserem Körper vorkommt. Im frischen Zustand besitzt er eine bläulich-weiße Farbe und ist milchig durchscheinend. In der Entwicklungsphase des Menschen steht der Knorpel als Vorstufe der späteren Knochen als Grundmaterial zur Verfügung. Beim Erwachsenen kommt er hauptsächlich an den Gelenkflächen und sonst nur noch an Teilen des Nasenskelettes, den mittleren und tiefen Luftwegen und am sternalen Rippenanteil vor.



Besonders an den Gelenkflächen muß der Knorpel auf Grund der auf die kleine Fläche wirkende Kräfte starken Belastungen standhalten. Er übernimmt hier den Schutz des darunterliegenden Knochens, überträgt die Druck- und Scherkräfte und kann die Inkongruenz zwischen Gelenkflächen zum Teil ausgleichen. Seine Dicke variiert von 0,2 mm an kleinen Gelenken bis zu 6,4 mm an der Patella (Shepherd und Seedhom, 1999). Durch seine Struktur und die Synovialflüssigkeit werden in den Gelenken sehr geringe Reibungskoeffizienten erreicht (Poole 1993).

### **1.2.2 Chondrozyten**

Chondrozyten sind definitionsgemäß Zellen, die in eine Knorpelmatrix eingebettet sind. Ihre Anzahl macht einen Anteil von 1 – 5% des Knorpelvolumens aus (Chung et al., 1995).

Ihre physiologische Aufgabe besteht darin, durch Synthese die Menge und Zusammensetzung der Matrix zu regulieren (Cancedda et al., 1995). Die Ernährung der Chondrozyten erfolgt über die Synovialflüssigkeit per diffusionem (Greenwald und Haynes 1969). Pro Milligramm Trockengewicht enthält der Knorpel 30µg DNA (Moskalewski 1981).

Lichtmikroskopisch imponieren kleine runde Zellkerne, die von einem glykogenreichen Zytoplasma mit Fetteinschlüssen umgeben sind. Sie liegen bevorzugt in einzelnen oder kleinen, gradzahligen Gruppen in Knorpelhöhlen (Chondrone). Diese werden als "isogene" Gruppen bezeichnet, in denen unterschiedliche Reifungsformen vorkommen können.

Elektronenmikroskopisch fallen im Zytoplasma Mitochondrien, ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex auf (Ghadially 1983). Die Vernetzung mit Matrixkollagenen erfolgt durch die von den Chondrozyten synthetisierten chondrozytenspezifischen Bindungsproteinen Chondronektin und Anchorin CII (Hewitt et al., 1980, Mollenhauer et al., 1984).

Die Hauptfunktionen der Chondrozyten bestehen in der Synthese von Matrixmolekülen, dem Ersatz von zugrundegegangenen Molekülen und der Adaption von Knorpelgewebe an veränderte Ansprüche (Buckwalter et al., 1993).

Eine besondere Funktionen nehmen die sogenannten hypertrophen Chondrozyten ein. Sie befinden sich bevorzugt im Epiphysenfugenbereich, synthetisieren Kollagen X und können sich, wie in Studien an Hühnern belegt, zu Osteoblasten differenzieren (Galotto et al., 1994, Gentili et al., 1993).

Zur Durchführung der eigenen Untersuchungen war es für die Zellkultivierung von Vorteil, daß Chondrozyten sehr resistente Zellen sind. Es konnte ferner nachgewiesen werden, daß die gesamte Struktur der Chondrozyten auch 21 Stunden nach Individualtod noch gut erhalten war (Ghadially 1983). Weitere Studien belegen, daß Chondrozyten in vitro bei 4°C in Kulturmedium 4 – 7 Wochen überleben können (Hemmen et al., 1991) und auch nach Einfrieren in Stickstoff überlebensfähig sind (Tomford et al., 1984).

### **1.2.3 Knorpelgrundsubstanz**

Die Knorpelgrundsubstanz besteht bis zu 80% aus Wasser, bezogen auf das Trockengewicht machen das Kollagen 60% (davon 90% Kollagen Typ II), Proteoglykane 25-35% und Mineralienstoffe 15-20% aus (Buckwalter und Mankin, 1998). Die Grundsubstanz um den Chondrozyten läßt sich in eine Knorpelkapsel und einen Knorpelhof unterteilen. Die Knorpelkapsel besteht aus kollagenen Fibrillen (Typ II und IV), die deutlich dünner als die des Hofes sind. Diese sind dicker, lassen eine Querstreifung erkennen und bestehen überwiegend aus Kollagen Typ II (Palmer et al., 1994).

Kollagen Typ II ist der Hauptbestandteil des hyalinen Knorpels, daneben kommen in geringer Zahl die Typen I, V, VI, IX, X und XI vor.

Typ II Kollagen gehört zu den Fibrillen bildenden Kollagenen (Löffler 1998) und ist im Nativknorpel ohne polarisierendes Licht nicht von der umgebenden Matrix abzugrenzen, da es von dieser gewissermaßen maskiert wird (Putz 1994).

Strukturell besteht Kollagen aus einer linksgängigen Helix, die sich bei Kollagen Typ II aus drei Helices zu einer Tripelhelix zusammenlagert. Diese können sich wiederum aus fünf Tripelhelices zu einer Mikrofibrille zusammenlagern (Löffler 1998). Die

Verknüpfung des Kollagens Typ II mit den Aggrecanen der Matrix erfolgt mit Hilfe von Hydroxylysin, das die Disaccharide bindet. Die traktionelle Anordnung der Fibrillen erlaubt durch diese Verspannung und Zusammenfassung von Knorpelnestern eine gewisse Zug- und Druckfestigkeit (Putz 1994).

Proteoglykane erzeugen mit Hyaluronat und den Kollagenen ein dreidimensionales Netzwerk, durch das der Knorpel seine Anordnung halten kann (Löffler 1998). Die aus ca. 2000 Aminosäuren bestehenden Proteoglykane sind das Grundprotein, das durch Anlagerung von Glykosaminoglykanketten zu einem Proteoglykanmonomer wird und als Aggrecan bezeichnet werden. Durch die Bindung mit Hyaluronsäure entsteht ein großes Proteoglykan-Hyaluronsäure-Molekül.

Diese gesamte Anordnung entspricht den Ansprüchen, die an hyalinen Knorpel gestellt werden und sorgt so für eine hohe Elastizität und die Möglichkeit der Druckbelastung.

#### **1.2.4 Knorpelstoffwechsel**

Wie oben erwähnt, verfügt der Knorpel über keinerlei Blut- oder Lymphgefäße (Poole 1994).

Es werden daher zwei Wege als mögliche Ernährungswege diskutiert: Zum Einen über die Synovia, zum Anderen durch den Markraum. Tests mit fluoreszierenden Farbstoffen zeigten eine Tendenz, aus dem Markraum durch Knochenspalten in den Knorpel zu diffundieren (Greenwald 1969). Allerdings scheint es, daß der synoviale Weg bevorzugt wird, da dieser über die gesamte synoviale Fläche des Knorpels erfolgen kann und nicht nur über einzelne Knochenspalten wie beim Weg über den Markraum (Honner und Thompson, 1971).

Problematisch für den Knorpel ist, daß innerhalb dieses Ernährungsweges überall Störungen auftreten können, die die Versorgung mit Nährstoffen maßgeblich behindern, sogar verhindern können (Niethard und Pfeil, 1997).

Der gesamte Prozeß der Ernährung erfolgt durch Diffusion der Nährstoffe. Da innerhalb des Knorpels ein erheblicher Konzentrationsgradient aufrechterhalten werden muß, erfolgt dies zusätzlich durch die normale Belastung des Knorpels.

Diese bewirkt durch Kompression ein Auspressen und durch Entlastung ein Ansaugen der Synovialflüssigkeit in den Knorpel, was einen Austausch der Stoffwechselprodukte fördert (Lee et al., 1997).

Problematisch dabei ist, daß bei einem vorgeschädigten Gelenk der Patient schmerzbedingt eine Schonung des Gelenkes bevorzugt und damit einen kontinuierlichen Stoffwechseltransport erschwert. Dadurch wird auch die von den Chondrozyten eingeleitete Reparatur des Knorpels erschwert und infolgedessen schreitet die Schädigung fort (Debrunner 1994).

### 1.2.5 Struktureller Aufbau

Die Struktur und Anordnung der Zellen sowie die Zusammensetzung der Zellen erlauben eine Gliederung in Zonen nach *O'Connor et al.*:

Tab. 1.1 Schematische Darstellung der Knorpelzellenstruktur nach *o'Connor et al. (1998)*

<b>Zone</b>	<b>Zellen (Struktur und Anordnung)</b>	<b>Kollagen (Gehalt und Anordnung)</b>	<b>Proteoglykane (Gehalt)</b>
Oberflächliche I	Einzelne, ellipsoid	++++, tangential	+
Mittlere II	Einzelne, ovoid, größer als in I	++, regellos	++
III	Einzelne o. Paare, größer als in II	+, regellos	+++
IVA	Einzelne o. Paare, größer als in III	+, regellos	++++
Tiefe IVB	Kleine Säulen aus 2-4 Zellen	+++ , senkrecht	++
Mineralisierung Tidemark			

1. Die oberflächliche Schicht (Tangentialschicht) besteht aus parallel zur Oberfläche verlaufenden kollagenen Fibrillen. Sie ist nur an den Gelenkrändern fest mit der Knorpelmatrix verbunden (Teshima et al., 1995). Am Übergang zur Gelenkkapsel geht sie in die Membrana synovialis über (Drenckhahn 1994).
2. Die Mittlere Zone (Übergangszone) macht ca. 40-45% des Gesamtvolumens aus (Poole 1993). Der Kollagenfibrillenverlauf ist regellos, und die Fasern zeigen eine für diese Zone typisches Überkreuzen. Die Zellen sind groß, unregelmäßig oval und zum Teil paarig (Chondron) liegend (Drenckhahn 1994, Tillmann 1998).
3. Die tiefe Zone (Radiärzone) mit länglichen, säulenförmig angeordneten Zellen, die senkrecht zur Knorpeloberfläche stehen (Poole 1993).
4. Als vierte Zone, die sogenannte Mineralisierungszone des Knorpels, die mit den Säulen des subchondralen Knochengewebes verbunden ist (Palmer et al., 1994). Sie ist von der unverkalkten Zone durch eine oder mehrere unregelmäßige, schmale, basophile Linien „tidemarks“ getrennt (Poole 1993).

### 1.3 Arthrose

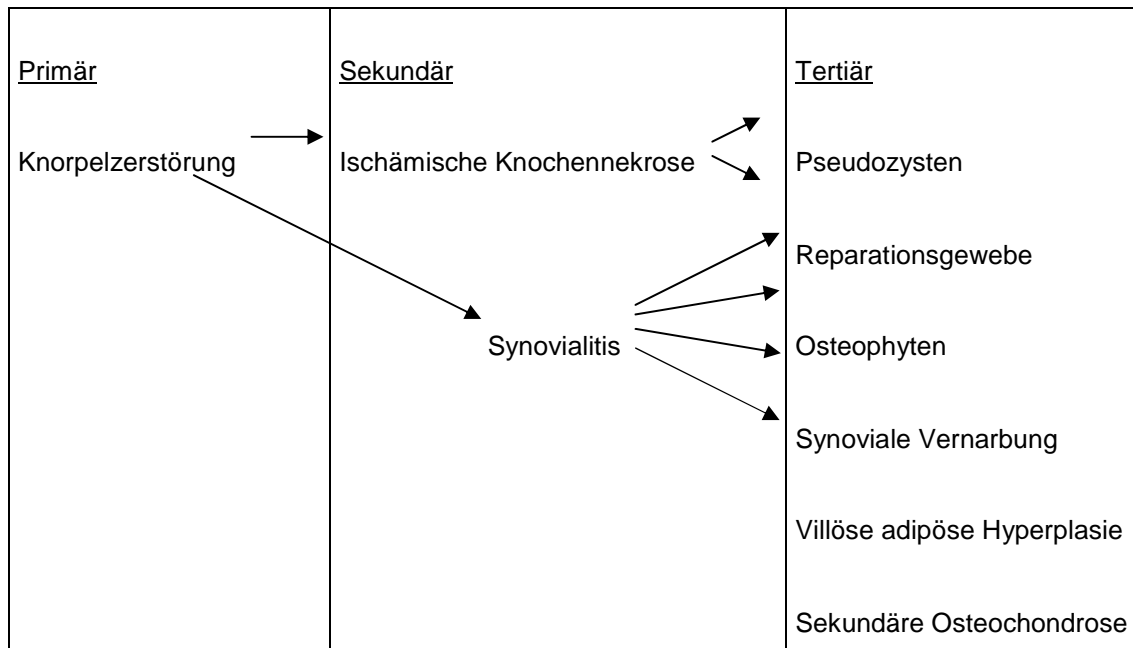
Nach allgemein anerkannter Definition wird die Arthrose als „degenerative Gelenkerkrankung, die vorwiegend bei einem Mißverhältnis zwischen Beanspruchung und Beschaffenheit bzw. Leistungsfähigkeit der einzelnen Gelenkanteile u. - gewebe entsteht“, beschrieben (Pschyrembel, 1994)

Die klinischen Symptome sind meist subjektiv und werden als Anlauf-, Belastungs-, Bewegungs- und Ermüdungsschmerz beschrieben. Radiologisch läßt sich eine Gelenkspaltverschmälerung durch den Knorpelschwund und Osteophyten nachweisen. Für die Ätiologie der Arthrose werden in der Literatur sehr viele verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Es werden biochemische Defekte beschrieben, die innerhalb der Knorpelgenese Störungen verursachen können, die schon in der Kindheit eine Prädisponierung vermuten lassen (Vikkula et al., 1993). Auch werden Traumata und wiederholte Mikrotraumen, z.B. durch Sport in die Betrachtung mit aufgenommen. Es wird davon ausgegangen, daß durch diese Traumen Umstellungen und Fehlbelastungen im Gelenk verursacht werden, die wiederum ursächlich den Knorpel traumatisieren (Grelsamer et al., 1995, Wedge et al., 1991). Die Zunahme der Arthrose in den letzten Jahren läßt die Hypothese zu, daß die Überbelastung durch Übergewicht einen entscheidenden Anteil zur Entstehung beiträgt. Als ein Beispiel ist eine Assoziation durch Heben schwerer Lasten für die Entstehung der Kniegelenksarthrose verantwortlich (Cooper et al., 1996). Desweiteren gibt es unzählige Studien, die sich mit unterschiedlichsten Lokalisationen der Arthrose innerhalb verschiedenster Sportarten befassen (Maetzel et al., 1997).

Pathomorphologisch läßt sich die Entstehung der morphologischen Veränderungen in unterschiedliche Stadien einteilen. Als primäres Stadium wird die Knorpelzerstörung mit einem Glanzverlust und gelblichen Verfärbung des Knorpels postuliert (Ferguson 1964). Gleichzeitig tritt eine Erweichung der Knorpelfläche ein, und es bilden sich Risse (Harrison et al., 1953).

Als sekundäre Form wird die ischämische Knochennekrose mit Untergang von Osteozyten in den oberflächlichen Zonen der Knochenoberfläche beschrieben (Sokoloff 1980, Bitounis und Solomon, 1990). Die weiteren Veränderungen sind in Tabelle 1.2 ersichtlich.

Tab. 1.2 Arthrotische Gelenkumgestaltung aus Mohr, 2000.



## 1.4 Transforming Growth Factor $\beta$ ( $TGF-\beta$ )

$TGF-\beta$  gehört zu einer Reihe von extrazellulären Signalstoffen, die viele Aufgaben bei der Steuerung und Entwicklung übernehmen. Fast alle Zelltypen des Körpers sind an der Synthese von  $TGF$  beteiligt (Roberts et al., 1990). Die Mitglieder der  $TGF-\beta$ -Familie sind Homodimere und weisen untereinander eine 60-80%ige Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen auf. Dabei sind fünf Isoformen bekannt:  $TGF-\beta 1-3$  in Säugetieren,  $TGF-\beta 4$  im Huhn und  $TGF-\beta 5$  im Krallenfrosch.

Die Wirkungsweise der  $TGF$  Untergruppen ist sehr unterschiedlich. Einige transformieren Zellen, andere hemmen die Proliferation und können die Bildung von weiteren Wachstumsfaktoren induzieren.

In dieser Arbeit wurde  $TGF-\beta 1$  untersucht. Die aktive Form des  $TGF-\beta 1$  ist ein 25 kDa Homodimer, dessen zwei identische Untereinheiten aus jeweils 112 Aminosäuren bestehen und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Massagué et al., 1990). Humanes rekombinantes  $TGF-\beta 1$  besitzt *in vivo* eine Halbwertszeit von ca. 90 Tagen, wohingegen das aktivierte  $TGF-\beta 1$  innerhalb von zwei bis drei Minuten durch die Leber verstoffwechselt wird (Wakefield et al., 1990). Nach Applikation von menschlichem  $TGF-\beta 1$  *in vivo* konnte nachgewiesen werden,

daß einerseits ein proliferativer Effekt bei Zellen zu erkennen ist, andererseits die Wirkung von *TGF $\beta$ 1* auf knochenbildende Zellen inhibitorisch ist (Zellin et al., 1998).

Die eigentliche Wirkung (Schematisch in Abb. 1.1) von *TGF- $\beta$ 1* entsteht durch die Bindung des Zytokins an spezifische Membranrezeptoren, die das extrazelluläre Signal in den Zellkern weiterleiten. Hier wird dann die Aktivität und Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und Gene reguliert. Im Falle der Signaltransduktion des *TGF- $\beta$*  wurden sogenannte T $\beta$ -Rezeptoren (Typ I und Typ II) gefunden, die zur Familie der transmembranen-Serin/Threonin Kinase Rezeptoren gehören. *TGF- $\beta$ 1* bindet zunächst an den T $\beta$ RII, dadurch kommt es zu einer Interaktion mit T $\beta$ RI, und es bildet sich ein tetramerer Rezeptorenkomplex aus. Bei der Weiterleitung dieses Komplexes in den Zellkern sind als „Smad“ bezeichnete zytoplasmatische Proteine beteiligt (Derynck u. Feng 1997, Padgett et al., 1998). Smad2 und 3 übertragen das *TGF- $\beta$*  Signal, Smad4 ist ein Mediator in dieser Kaskade. Smad6 und 7 blockieren das Signal. In Versuchen wurde Smad2 in proliferierenden Chondrozyten sehr stark exprimiert, während Smad3 in reifen Chondrozyten exprimiert wurde (Sakou et al., 1999, Miyazono et al., 2001).

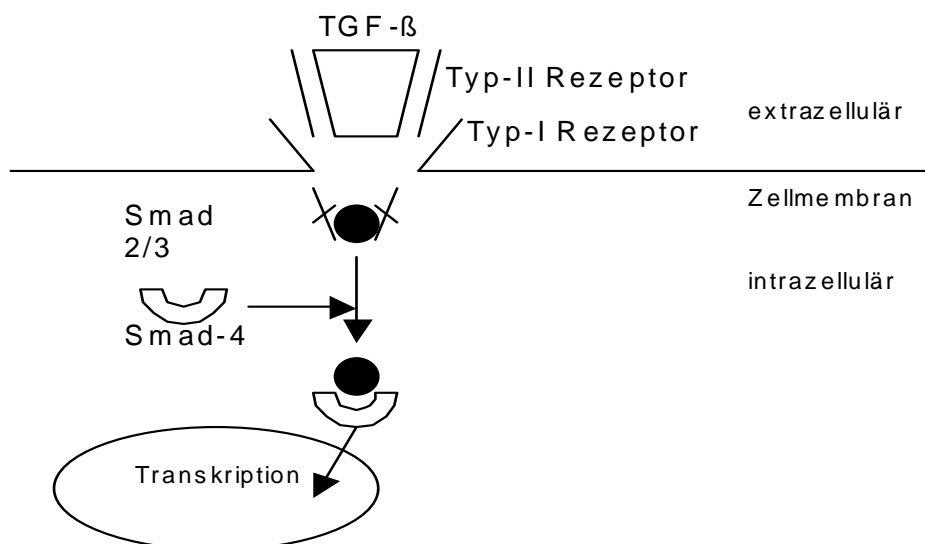


Abb.1.1 Modell Rezeptorvermittlung durch TGF- $\beta$  und der Smad-Aktivität (mod. nach Derynck und Feng 1997)



*TGF-β1* hemmt endotheliale, epitheliale und hämatopoetische Zellen, wohingegen die Zellen mesenchymalen Ursprungs stimuliert werden (Lawrence 1996). Als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren wurde *TGF-β1* während der Wundheilung ausgemacht (Roberts et al., 1990). Weiterhin wird ihm einerseits die Hemmung der Zellproliferation, andererseits speziell in der mesenchymalen Zellreihe ein proliferativer Effekt nachgesagt (Bujia 1995). Mittlerweile wird davon ausgegangen, daß *TGF-β* eine zentrale Rolle im Chondrozytenwachstum und der Differenzierung spielt (Frenkel et al., 2000). *TGF-β1* konnte in Versuchen in allen Knorpelzonen und hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden (Fukumura et al., 1998). Während bei im Monolayer kultivierten Chondrozyten eine Dedifferenzierung zu Osteozyten stattfand, konnte in 3-D Alginat Kulturen eine Redifferenzierung nachgewiesen werden (Yaeger et al., 1997, Jakob et al., 2001). Unter Einfluß von *TGF-β1* konnte in Versuchen eine starke proliferationsfördernde Eigenschaft, die sich in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren noch erhöhte, nachgewiesen werden (Jakob et al., 2001, Song et al., 2003). Auch wurde unter *TGF-β1* eine Synthesesteigerung der extrazellulären Matrix von Proteoglykanen ( van Breuningen et al., 1994) und Kollagenen, im speziellen Kollagen I und II beobachtet. (Moeller et al., 1999, 2000, Jakob et al., 2001). Der Einfluß von *TGF-β1* führt zu einer Induktion der DNA-Synthese und zur Ausbildung von Brutkapseln.

Im Rahmen von Osteoarthritis konnten in der Synovialflüssigkeit von Patienten erhöhte Spiegel von aktivem *TGF-β* nachgewiesen werden (Fava et al., 1989).

Der Einfluß von *TGF-β* auf *Cbfa1* in Osteoblasten ist nachgewiesen (Lee et al., 2000). *TGF-β1* verursachte eine Repression von *Cbfa1* über Smad3 und senkte somit die *Cbfa1* und Osteocalcin Expression und blockierte die Osteoblasten Differenzierung (Alliston et al., 2001).

## 1.5 Core Binding Factor A1 (*Cbfa1*)

Core Binding Factor A1 (*Cbfa1*) gehört zu der Familie der Core-Binding-Faktoren (CBF), die heterodimere Transkriptionsfaktoren sind. Sie setzen sich aus einer direkt an die DNA bindenden  $\alpha$  und einer die DNA-Bindung modulierenden  $\beta$ -Einheit zusammen (Ogawa et al., 1993). Sie werden auch als *Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2 (PEBP2)* bezeichnet (Yoshida et al., 2002).

Bei Säugetieren wurden drei verschiedene, die  $\alpha$ -Einheit kodierende Gene, gefunden (*Cbfa1*, *Cbfa2*, *Cbfa3*) und ein Gen für die  $\beta$ -Einheit (Ito et al., 1999).

Die drei *Cbfa* Proteine besitzen eine *Runt*-Domäne, die aufgrund ihrer Homologie zum *Drosophila* Pair-Rule-Gen *runt* (Yoshida et al., 2002) gehören. Innerhalb der *Cbf* Gruppe ist *Cbfa2* das bisher am besten untersuchte Gen und das am häufigsten an akuten myeloischen Leukämien (AML1) beteiligte Gen (Zent et al., 1997). Bei Studien mit knock out Mäusen mit *Cbfa2*-Defizienz konnte keinerlei embryonale Blutbildung in der Leber gefunden werden. (Wang et al., 1996).

Um eine international einheitliche Nomenklatur für die Gene zu finden, einigte man sich auf den Begriff *runt-related-genes* RUNX. Das führte zu folgender internationaler Einteilung:

Tab. 1.3 Einteilung der *runt-related-genes* aus Yoshida et al., 2002

RUNX1	<i>Cbfa2</i>	PEBP2alphaB	AML1
RUNX2	<b><i>Cbfa1</i></b>	PEBP2alphaA	AML3
RUNX3	<i>Cbfa3</i>	PEBP2alphaC	AML2

### 1.5.1 Struktur und Funktion der *Cbfa1*-Einheit

Wie alle Runt verwandten Proteine enthält *Cbfa* die Runt-Domäne, welche die DNA-bindende Domäne darstellt. Eine prolin-serin-threoninreiche Region befindet sich C-terminal. Am aminoterminalen Ende besitzt es zwei aktivierende Domänen AD1 und AD2 (Thirunavukkarasu et al., 1998).

*Cbfa1* scheint, obwohl auch in T-Zellen, Thymus und im Hoden vorkommend, keine entscheidende Rolle im hämatopoetischen System zu haben (Ogawa et al., 1993, Satake et al., 1995).

Allerdings konnte *Cbfa1* als ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung ausgemacht werden. In Versuchen mit Mäusen wurde *Cbfa1* in mesenchymalen Verdichtungszone gefunden (Otto et al., 1997, Harada et al., 1999), und eine gezielte Inaktivierung führte zu einem Ausbleiben der Knochenentwicklung (Ogawa et al., 1993). Weitere Studien belegen einen Zusammenhang mit der cleidocranialen Dysplasie (CCD), bei der es autosomal-dominant zu einer Hypoplasie bzw. Aplasie unter anderem des Schlüsselbeins, der Fontanellen, einer kleinen Statur und weiterer Veränderungen im skelettalen Entwicklungszyklus kommt (Otto et al., 1997, Mundlos et al., 1997). Auch in der frühen Skelettentwicklung, in der sich mesenchymale Stammzellen zu Knorpelgerüsten zusammenfügen, wurde eine erhöhte Expression von *Cbfa1* gefunden (Ducy et al., 1997). In weiteren Studien konnte eine Expression von *Cbfa1* in der Anlage des Knorpelgewebes im Perichondrium nachgewiesen werden (Kim et al., 1999).

Im Rahmen der enchondralen Ossifikation wird erst ein Knorpelmodell des Knochens angelegt, das dann zu einem späteren Zeitpunkt durch Knochen ersetzt wird (Junquera und Carniero 1996). Das wichtigste Stadium innerhalb dieses Prozesses ist die Kalzifizierung des Knorpels. Chondrozyten lassen sich in hypertrophe, die hauptsächlich Kollagen X (Linsenmayer et al., 1991) und prähypertrophe, die hauptsächlich Kollagen II synthetisieren, einteilen (Mundlos 1994). In jedem der Umbauvorgänge ist die Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten einer der essentiellen Vorgänge, ohne die kein Knochen entstehen würde.

Es wird davon ausgegangen, daß *Cbfa1* hier einen hohen Stellenwert einnimmt und ein essentieller positiver Regulator für die Chondrozytendifferenzierung ist (Kim et

al., 1999). In etlichen Versuchen konnte gezeigt werden, daß *Cbfa1* eine Regulation bei der Hypertrophie der Chondrozyten induziert (Inada et al., 1999, Kim et al., 1999, de Crombrughe et al., 2001). Neuere Studien wurden mit *Runx2/Cbfa1* überexprimierenden Kükern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß *Runx2/Cbfa1* die Chondrogenese einerseits durch Aufrechterhalten, andererseits durch Einleitung der frühen Chondrozytendifferenzierung beeinflusst (Stricker et al., 2002). Es wird davon ausgegangen, daß *Cbfa1* eines der Regulationsgene für die Osteoblasten, Chondrozyten und Osteoklasten ist (Kuboki et al., 2003, Rabie et al., 2004).

Neueste Studien belegen nochmals, daß *Runx2* eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Chondrozytenphänotypes spielt (Enomoto et al., 2004).

## 1.6 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase ( *HPRT* )

Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*) ist ein Enzym des Purinstoffwechsels und katalysiert die Synthese der Mononukleotide Inosinmonophosphat und Guaninmonophosphat aus den Purinbasen Hypoxanthin und Guanin. Der Vorteil für Zellkultivierung besteht darin, daß die für das *HPRT*-Gen kodierenden Sequenzen kein essentielles Gen repräsentieren. In Kultur müssen Zellen die Purine nicht über den Purinstoffwechsel nutzen, sondern können sie auch *de novo* syntetisieren (Bradley et al., 1981). In dieser Studie fungiert das *HPRT* als Housekeeping-Gen, das auch als eines der geeignetsten Kontrollgene angesehen wird (Vandesompele et al., 2002).

## 2 FRAGESTELLUNG/ ZIEL DER ARBEIT

Wie schon in der Einleitung dargestellt, hat die Heilung von Knorpeldefekten im Bereich der operativen Orthopädie einen großen Stellenwert. Für die Grundlagenforschung erwachsen hieraus große Ansprüche. Wie schon erwähnt, gibt es nicht nur mit dem von *Brittberg et al.* (1993, 1995) und *Peterson et al.* (2002) entwickelten Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) Versuche einmal aufgetretene Knorpeldefekte zu ersetzen, sondern auch vielfältige andere Ansätze, die bereits in der Einleitung Erwähnung finden. Ein entscheidender Aspekt der durch diese Arbeit unterstützt werden soll, ist die Züchtung von Knorpelzellen *in vitro*, um sie wie bei der ACT oder andern Verfahren, bei denen die Chondrozyten an Matrices gebunden werden (MACI), dem Patienten nach Züchtung wieder zu implantieren. Eines der Hauptprobleme bei dieser Technik ist, daß sich die *in vitro* kultivierten Chondrozyten sehr schnell zu dedifferenzieren beginnen und dabei in einen mehr osteoblastären Phänotyp übergehen. Deshalb wird diese Problematik aus unterschiedlichen molekulargenetischen Richtungen angegangen. Zum Einen werden die Kultivierungsbedingungen verändert, zum Anderen wird versucht durch die Zugabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren einen Einfluß auf die Dedifferenzierung von Chondrozyten zu nehmen, um so den Phänotyp aufrecht erhalten zu können.

Einer dieser Wachstumsfaktoren, der in zunehmendem Maße innerhalb von Studien erforscht wird, ist *TGF- $\beta$ 1*. Bekanntlich beeinflusst er das Wachstumsverhalten von Chondrozyten. Die Idee, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ist, dass es unterstützend zu dem heutigen Stand der Forschung hilfreich wäre, ein Modell zur Verfügung zu haben, das einen direkten Einfluß von *TGF- $\beta$ 1* auf *Cbfa1* nachweisen und somit direkt in die Chondrozytendifferenzierung eingreifen kann. *Cbfa1* wurde aufgrund seiner bekannten Wirkung im Bereich der Dedifferenzierung von Chondroblasten zu Osteoblasten ausgewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ein direkter Einfluß von *TGF- $\beta$ 1* auf den osteoblastären Differenzierungsfaktor *Cbfa1* nachgewiesen und somit indirekt eine Auswirkung auf Chondrozyten gezeigt werden kann. Als gemessener Parameter galt die Expression des *Cbfa1 in vitro*.

Vor Beginn und während der Versuchsreihen stellten sich weitere Fragen, die innerhalb dieser Arbeit zu beantworten waren.

- **Frage 1:** Läßt sich innerhalb der Versuche ein proliferationsfördernder Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Chondrozyten nachweisen?
- **Frage 2:** Zeigt eine eventuelle Proliferationsförderung einen Einfluß auf Cbfa1?
- **Frage 3:** In welchem Maße wird Cbfa1 von TGF- $\beta$ 1 beeinflusst und in welche Richtung erfolgt die Beeinflussung?
- **Frage 4:** Ist unter dem Einfluß von TGF- $\beta$ 1 eine Redifferenzierung von Chondrozyten gemessen an Cbfa1 nachweisbar?
- **Frage 5:** Kann mit Hilfe der in dieser Arbeit gefundenen Wirkmechanismen ein mögliches Kultivierungsmodell für die Chondrozytenkultivierung entwickelt werden?

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Probenmaterial**

##### **3.1.1 Knorpelgewinnung**

Es wurden ausschließlich Knie-Knorpel verwendet, die die Orthopädische Klinik der Justus – Liebig Universität uns im Rahmen von Schlitten- oder Totalendoprothesenoperationen zur Verfügung stellte. Die Patienten wurden informiert und waren mit der wissenschaftlichen Bearbeitung ihres durch die Operations-Indikation entfernten Knorpelgewebes einverstanden („informed consent“). Bei allen Patienten lag eine mehr oder weniger starke arthrotische Veränderung der Knorpelflächen vor. Die Knorpel wurden verworfen, wenn eine maximale Abnutzung mit vollständiger Arrodierung der Knorpelflächen vorlag und nur noch der darunter liegende Knochen vorhanden war. Die Versuche wurden an 17 Knorpelproben durchgeführt (Alter im Durchschnitt 62,8 Jahre, Spannweite 34 – 80 Jahre, weiblich 9, männlich 8) (Tabelle im Anhang) .

Weiterhin wurden bei den jeweiligen Knorpeln nur optisch „gesunde“ Areale, also ohne Knorpeldefekte, verwendet. Vorteilhaft erwies sich bei diesem Verfahren, daß der Knorpel direkt nach der Operation mit nur kurzer zeitlicher Verzögerung (max. 3 Std.) verarbeitet werden konnte. Die sterilen Bedingungen bei der Aufarbeitung verringerten die Gefahr einer Kontamination erheblich. Das entnommene Material wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C in Hanks´s Lösung gelagert.

##### **3.1.2 Isolierung von Chondrozyten aus Knorpelgewebe**

Die Isolierung der Chondrozyten erfolgte nach etablierten Methoden (Kuettnner et al., 1982). Die gesamte Aufarbeitung wurde unter sterilen Bedingungen unter der Microflow durchgeführt.

Dabei wurden die Chondrozyten über 5 Stunden bei 37°C mit 600 U/min unter Zugabe von Kollagenaselösung (Kollagenase XI 20 mg, Desoxyribonuklease 2,5 mg und DMEM/ Ham´s F12 K) enzymatisch aus der umgebenden Knorpelmatrix isoliert.

Für die Aufarbeitung des Knorpels waren folgende Schritte erforderlich:

Das Knieoperationsmaterial wurde in Hank's gespült und anschließend in eine Petrischale gegeben, um die Gelenkflächen begutachten zu können.

Jetzt wurde der Knorpel mit einem Skalpell von seiner Knochenunterlage getrennt und in ca. 1mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten (Abb. 3.1).

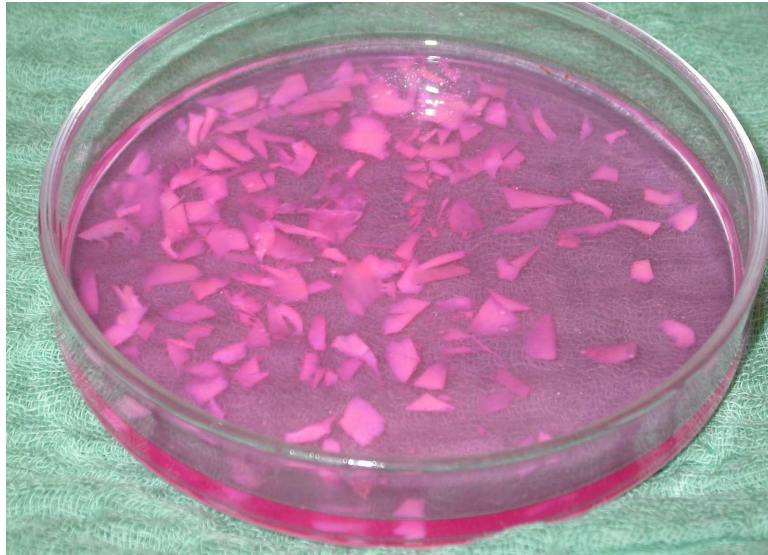


Abb. 3.1 Aufgearbeitete Knorpelstücke zur weiteren Verwendung und Isolierung der Chondrozyten

Zur weitestgehenden Befreiung des Knorpels von knorpelfremden Substanzen (Fett, Blut und Knochenfragmente) wurden die so aufgearbeiteten Knorpelstücke mehrere Male in einem 50ml Zentrifugenröhrchen mit Hank's gewaschen und bei 800U/min abzentrifugiert, bis optisch keine Verunreinigung mehr zu erkennen war. Danach wurde der fragmentierte Knorpel in einen 50ml Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer umgefüllt und die Kollagenaselösung mittels eines Sterilfilters (Porengröße 0,20µm) dazugegeben.

Nach 4-5 Stunden wurde der Chondrozyten-Kollagenase-Mix mit einer Pipette abgesaugt, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei 800U/min zentrifugiert. Um die weitere Trennung von Kollagenase und Chondrozyten zu erreichen, wurde das Zellpellett zweimal mit Hank's gewaschen und ebenfalls 10 min bei 800U/min abzentrifugiert. Im Anschluß daran erfolgten die Zellzahlbestimmung und Kultivierung.



## 3.2 Zellzählung

### 3.2.1 Elektronische Zellzählung

Direkt nach der Aufarbeitung des Knorpels wurden die Zellen mit einem Coulter Counter Feinpartikelzähler (Coulter Electronics Ltd., Luton, UK) gezählt und auf Kulturflaschen verteilt. Nach einer 14-tägigen Kultivierungsperiode, die notwendig war, um genügend Zellen für die Versuchsdurchführung zu erhalten, wurden sie jeweils vor jedem Ausbringen in Alginat oder Kulturflaschen erneut gezählt. Zum Messen wurden die Zellen in eine isotone, elektrisch leitende Lösung suspendiert und die Anzahl und Größenverteilung der Einzelpartikel bestimmt.

Der Coulter Counter besteht aus einer Meßkammer, in der Kathode und Anode in die Probenlösung tauchen. Eine frei wählbare Menge, bei uns 100µl wird durch die Kathode angesaugt. Da jedes Partikel eine Widerstandsänderung zwischen den Elektroden erzeugt, die proportional zur Partikelgröße ist, kann anhand der aufgenommenen Signale über die Zählzeit auf Größe (Impulshöhe) und Anzahl (Impulsanzahl) der Partikel geschlossen werden (Urban, 1998).

Um die Zellen für die Zählung vorzubereiten, wurden die Zellkulturen entweder abtrypsiniert, aus dem Alginat gelöst oder direkt nach der Knorpelaufarbeitung im Medium zentrifugiert und zur Reinigung dreimal mit Hank's gespült. Die Zellen wurden jedes mal abzentrifugiert und nach der letzten Spülung mit einem definierten Mediumvolumen (10ml) resuspendiert. Davon wurden 500µl abpipettiert und mit 9,5ml Isoton II-Elektrolytlösung in ein Probenröhrchen überführt und im Coulter Counter 10 mal 100µl ausgezählt. Mit dem daraus errechneten Mittelwert ließ sich auf die Anzahl der Zellen pro ml Probenvolumen schließen und die Gesamtzellzahl errechnen.

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times \text{VF} \times V_s \times 10$$

n: gemessene Zellzahl

VF: Verdünnungsfaktor = 20 (durch Verdünnung mit isotoner Kochsalzlösung)

V<sub>s</sub>: Volumen der Zellsuspension in ml

### 3.2.2 MTT-Test

Mit Hilfe dieses fotometrischen Verfahrens läßt sich schnell und quantitativ die Anzahl und Aktivität von Zellen testen. Es basiert auf einer aktiven Spaltung der Tetrazoliumringes durch mitochondrieneigene Enzyme; Infolgedessen kann diese Reaktion nur in vitalen Zellen stattfinden.

Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert und im Coulter Counter gezählt, in einer 96-Lochplatte (in unserem Fall 2.500 Zellen pro Well) verteilt und im Brutschrank über einen vorher definierten Zeitraum (in diesem Fall 10d) inkubiert. Jeden Tag wurde mittels ELISA Reader (LAB-Systems, Hagedorn) die Extinktion gemessen.

125mg MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyl]-tetrazoliumbromid (Thiazolblau, Sigma, Deisenhofen) wurden für 100ml MTT-Gebrauchslösung (gelblich) mit 60ml Medium, 15ml FCS und 25ml 0,9% NaCl gemischt, bei den vorher in 96-Lochplatten verteilten Zellen am jeweiligen Tag der Messung das Kulturmedium abgesaugt und 200µl MTT-Lösung pro well zugegeben. Im Anschluß daran wurde die Lochplatte bei 37°C 4 Stunden lang im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Tetrazoliumsalz von Dehydrogenasen zu Formazankristallen (dunkel blau) reduziert, nach der Inkubationszeit die MTT-Lösung entfernt und je 100µl /well Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen) zugegeben um die Formazankristalle aufzulösen. Innerhalb von 5-10 Minuten wurden die Platten im Elisa Reader gerüttelt, um die nun blau-violette Lösung zu homogenisieren. Die optische Dichte dieser Lösung wurde bei 520nm mit einer Referenzlänge von 690nm dreimal gemessen. Da die optische Dichte proportional zur Anzahl der vitalen Zellen und zu ihrer Aktivität ( Anzahl der Mitochondrien) (Mosmann 1983) ist, läßt sich dadurch über den Zeitverlauf eine Aussage über die Vermehrung der Zellen machen und in einer Wachstumskurve darstellen (Plumb , 2004).

### 3.3 Kultivierung der Chondrozyten

#### 3.3.1 Kulturmedium

Das Kulturmedium besteht aus 1x10l DMEM/ Ham's F12 K Trockensubstanz w/o NaHCO<sub>3</sub>, w/o Ca<sup>++</sup>, w: L-Glutamine (Sonderanfertigung, Fa. Biochrom AG), 100ml Pen./Streptomycin (Biochrom AG), 31g NaHCO<sub>3</sub> (Merck), 0,5g L-Ascorbic Acid (Sigma), 2x vial IST-Premix (Sigma) und 10l Aqua dest. (Baxter).

Ca. 50% der Wassermenge wurden in den Edelstahldruckbehälter (Sartorius) mit Magnetrührer und unter Zugabe der Trockensubstanz gegeben, anschließend die restlichen Reagenzien zugegeben, auf 10l mit Aqua dest. aufgefüllt und ca. 1 Stunde gerührt.

Dann erfolgte die Druckfiltration. Dazu mußten das Druckgefäß verschlossen, die Druckluftflasche und das Edelstahldruckfiltrationsgefäß (Sartorius) mit Membran- und Vorfilter verbunden werden. Der Druck wurde langsam auf 0,5bar eingestellt, bei zu langsamer Flußgeschwindigkeit konnte auf max. 1,5bar erhöht werden. Das Medium wurde in sterile Laborglasflaschen (500ml, Schott) abgefüllt und kann bei -20°C bis zu einem Jahr eingefroren werden. Zur Qualitätssicherung wurden die ersten und letzten 100-150ml in einer Flasche bei 37°C 5-7 Tage im Brutschrank bebrütet.

#### 3.3.2 TGF-β1

TGF-β1 wurde durch Verdünnen mit Hank's auf die entsprechende Konzentration von 0,1ng/ml und 0,01ng/ml gebracht. Die gewählten Konzentrationen waren hierbei in Vorversuchen die in 4.1 aufgeführt sind und in Korrelation der Literaturangaben (Blanko et al. 1995, Blumenfeld et al. 1997, Pangborn et al., 2005) als wirksam determiniert worden. Die jeweilige Konzentration wurde für eine 24-Lochplatte steril filtriert, mit der benötigten Menge DMEM/Ham's FK 12 vermischt und auf die Kulturen gebracht.

### 3.3.3 Im Monolayer

Es wurden Monolayerkulturen von den Chondrozyten angelegt, um eine Möglichkeit des Vergleichs mit dreidimensionalen Kulturen zu haben. Dazu wurden die gewonnenen Chondrozyten in jeweils zwei Monolayer Flaschen gegeben und mit DMEM/Ham's FK 12 + 10% FKS über zwei Wochen auf ca. 10 Mio. Zellen vermehrt, danach abtrypsiniert, gezählt und auf drei Monolayer Flaschen mit jeweils 2,5 Mio. Zellen gegeben. Auf den Zellrasen wurden 20ml Trypsin gegeben und bei 37°C im Brutschrank solange inkubiert bis sich die Zellen gelöst hatten. Danach wurde zweimal mit Hank's gespült und bei 800 U/min 10 min zentrifugiert. Sie wurden mit *TGF-β1* freiem und 0,1ng/ml und 0,01 ng/ml *TGF-β1* enthaltenem DMEM/Ham's FK 12 Medium + 20% FKS über 3 Passagen mit je 2 Wochen Kultivierungszeit gezüchtet. Der Mediumwechsel erfolgte nach vier Tagen. Es wurden Proben nach der ersten Aufzucht als Nativ (0) Probe und nach jeder Passage entnommen. Danach erfolgte die qualitative und quantitative Bestimmung.

Tab 3.1 Nach Gesamtdurchlauf einer Zellkultur wurden 10 Proben erhalten:

Nativ (0)	p0
Passage 1	p1 0 p1 0,1 TGF; p1 0,01 TGF
Passage 2	p2 0 p1; p2 0,1 TGF; p2 0,01 TGF
Passage 3	p3 0 p1; p3 0,1 TGF; p3 0,01 TGF

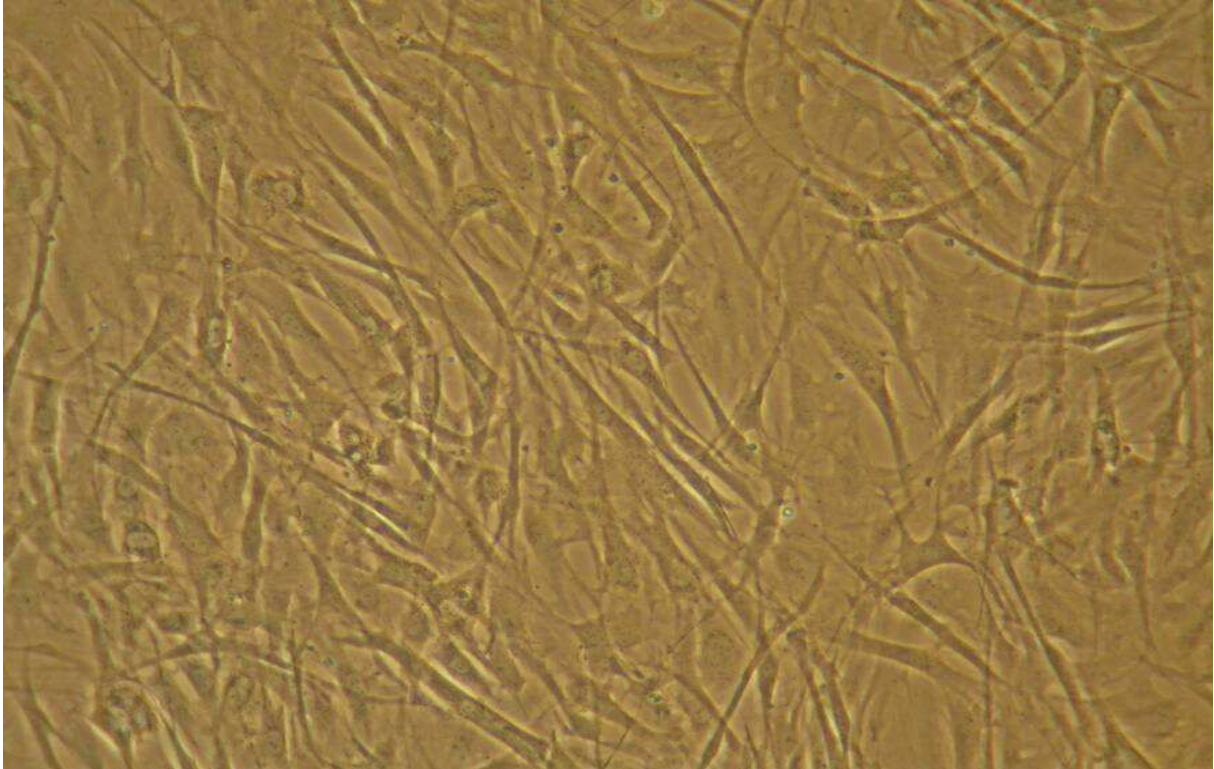


Abb. 3.2 Monolayer Wachstum von Chondrozyten in der Kulturflasche (ungefärbt, 40fache Vergrößerung)

### 3.3.4 Im Alginat

Um eine entsprechende Zellzahl von min 10 Mio. Zellen zu erreichen, war es notwendig, die Zellen in Monolayerkulturen über zwei Wochen zu züchten und danach eine Nativ (0) Probe zu entnehmen. Das restliche Zellpellet wurde bei 800 U/min für 10 min zentrifugiert und mit Alginatlösung resuspendiert, sodaß eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml Alginat erreicht wurde.

Zur Kultivierung wurden drei 24-Lochplatten mit ca. 1ml einer steril filtrierten  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gefüllt. Danach die Alginat-Zellsuspension mit einer 10ml Einmalspritze aufgezogen und über eine Kanüle ( Durchmesser 20G\*11/2) tropfenweise in die einzelnen Löcher getropft, bis ca. 10 Tropfen/Loch erreicht waren. Zum Auspolymerisieren wurden die Platten 10 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen, im Anschluß die  $\text{CaCl}_2$  Lösung abgesaugt und jeweils dreimal mit Hank's Lösung

gespült. Die Platten wurden mit 1 ml/ Loch DMEM/Ham's FK 12 + 20% FKS und zusätzlich einmal mit 0,1ng/ml und 0,01 ng/ml *TGF-β1* über drei Passagen jeweils vier Wochen inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage, wobei einmal mit Hank's Lösung gespült wurde. Zwischen den einzelnen Passagen erfolgte eine zweiwöchige Aufzucht in Monolayerflaschen mit Ham's FK 12 + 10% FKS.

Die Gewinnung der Verlaufspuren erfolgte nach 14 und 28 Tagen. Aus jeweils 8 Löchern wurden die Alginatbeads entnommen. Zur Entnahme wurde das Medium abgesaugt, die Beads in den einzelnen Löchern mit 20µl Auflösepuffer pro Bead ca. 1 min angelöst, aufgesaugt und in einem Eppendorf Röhrchen 15 ml nach Platten getrennt für 10 min. aufgelöst, anschließend für 10 min. bei 800 U/min zentrifugiert und zweimal mit 10 ml Hank's gewaschen und abzentrifugiert. Die einzelnen Proben wurden lysiert und bei -70°C eingefroren. Die restlichen 8 Alginat Löcher wurden auf dieselbe Weise aufgearbeitet und zur zweiwöchigen Aufzucht in die Monolayer Flaschen gegeben. Das Abtrypsinieren erfolgte wie oben beschrieben (Häuselmann et al. 1992).

Tab. 3.2 Nach Gesamtdurchlauf einer Zellkultur wurden 19 Proben erhalten:

Nativ (0)	p0
Passage 1	p1 14d 0; p1 14d 0,1 TGF; p1 14d 0,01 TGF; p1 28d 0 ;p1 28d 0,1 TGF p1 28d 0,01 TGF
Passage 2	p2 0 p1; p2 0,1 TGF; p2 0,01 TGF; p2 14d 0; p2 14d 0,1 TGF; p2 14d 0,01 TGF; p2 28d 0 ; p2 28d 0,1 TGF; p2 28d 0,01 TGF
Passage 3	p3 0 p1; p3 0,1 TGF; p3 0,01 TGF; p3 14d 0; p3 14d 0,1 TGF; p3 14d 0,01 TGF; p3 28d 0 ; p3 28d 0,1 TGF; p3 28d 0,01 TGF



Abb. 3.3 Chondrozyten in Alginkultur (ungefärbt, 2,5fache Vergrößerung)

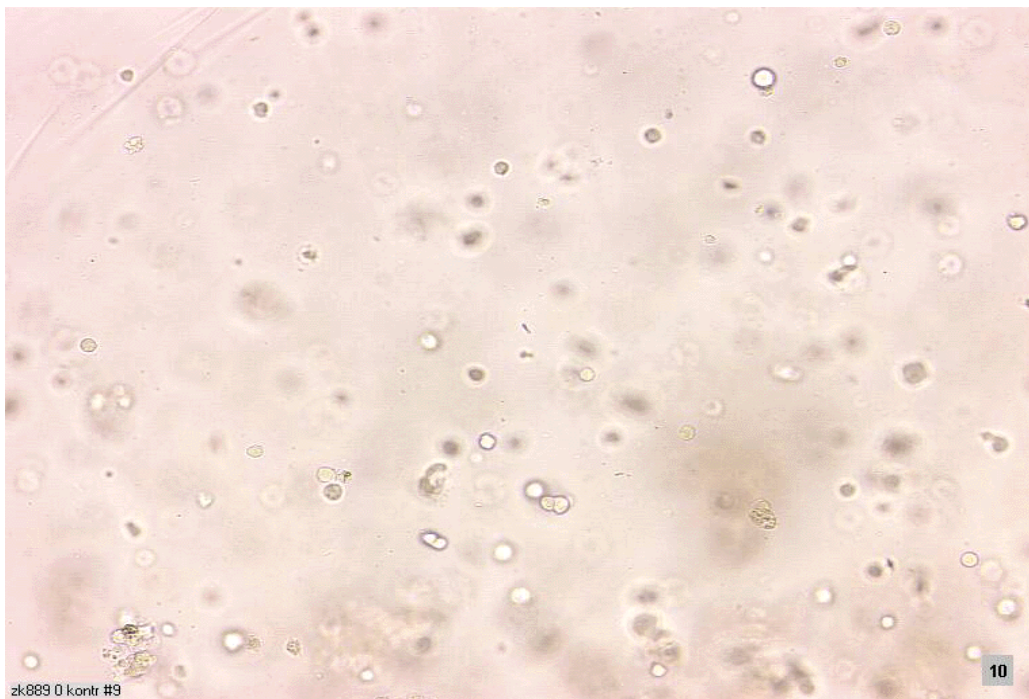


Abb. 3.4 Chondrozyten in Alginkultur, z.T. mit paariger Anordnung (ungefärbt, 10fache Vergrößerung)

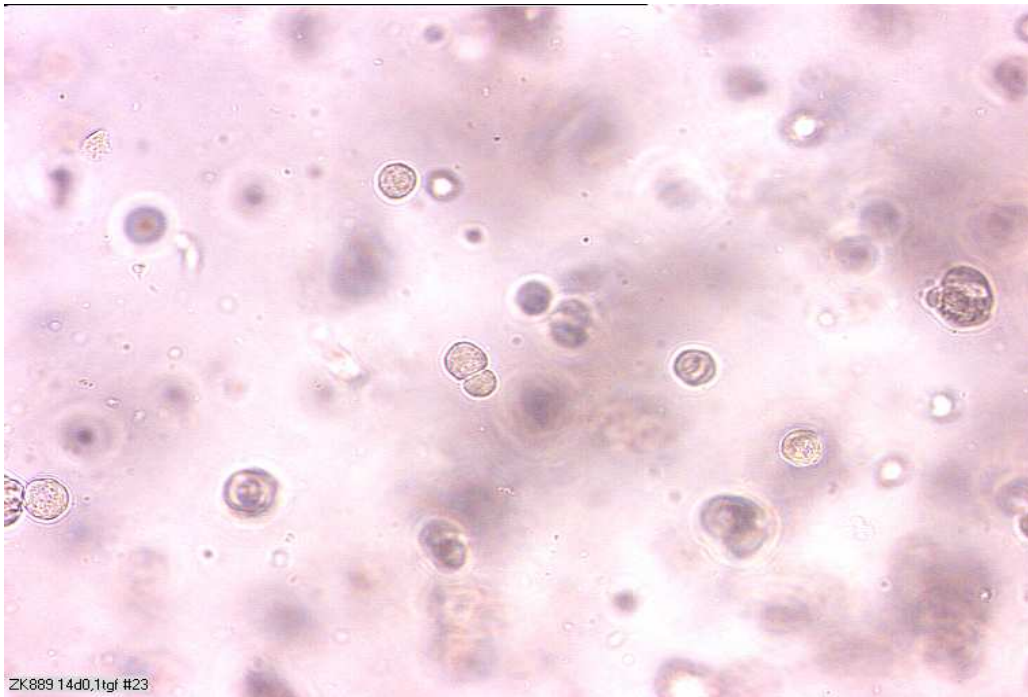


Abb. 3.5 Chondrozyten in Alginatkultur, z.T. mit chondronartiger Anordnung (ungefärbt, 20fache Vergrößerung)



## 3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 3.4.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Technik zur Amplifikation zum Nachweis eines bestimmten DNA- Abschnittes (Saiki et al. 1988, Mullis 1990). Um die Amplifikation zu starten, müssen zwei einzelsträngige Oligo-nukleotide (Primer) die zueinander komplementär sind, vorliegen. Der zwischen den Bindungsstellen der beiden Primern liegende DNA-Abschnitt wird von einer hitzestabilen DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxy-ribonukleotid-Triphosphaten in 5' → 3'-Richtung synthetisiert (Löffler, 1989). In mehreren Reaktionszyklen unterschiedlicher Temperatur (Tab. 3.5) wird die doppelsträngige DNA denaturiert, durch Abkühlung die Primer an die Nukleinsäure hybridisiert und durch die thermostabile Taq-Polymerase elongiert (Saiki et al., 1988). In jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA-Kopien jeweils verdoppelt. Nach den ersten beiden Amplifikationszyklen ist die Länge der amplifizierten DNA- Stränge noch nicht definiert. Erst ab dem dritten Zyklus liegen Amplikons mit beidseitig durch die beiden Primer definierten Enden vor, deren Anzahl in den folgenden Amplifikationszyklen exponentiell steigt. Die Anzahl der Kopien läßt sich nach der Formel  $(2^n - 2n)x$  berechnen, wobei  $n$ = Anzahl der Zyklen;  $2n$ = Produkt der ersten beiden Zyklen;  $x$ = Anzahl der ursprünglichen DNA – Matrizenstränge ist.

Die Produktakkumulation ist durch den Verbrauch der Reaktionskomponenten limitiert, die Verminderung der Polymeraseaktivität und die Rehybridisierung der PCR-Produkte. Die Reaktion geht dann in eine „Plateau-Phase“ über (Morrison und Gannon, 1994), in der keine weitere Produktakkumulation erfolgt. Man erreicht normalerweise in 20-40 Zyklen eine zur Auswertung ausreichende Menge an gewünschter DNA- Sequenz (Mullis et al., 1994, Bej et al., 1991).

Zur Durchführung der PCR wurde die cDNA zunächst auf Eis aufgetaut und jeweils 4µl cDNA in ein 0,5ml Eppendorf Hütchen pipettiert, dazu 46µl Mastermix (Tab 3.3) pipettiert, homogenisiert und die Proben im Thermocycler nach dem Programm aus Tabelle 3.5 geschrieben.

Tab. 3.3 PCR Mastermix zum Schreiben der DNA

Reagenzien	Volumen für 50µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	39,2µl
10x PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (5mM)	4,0µl
dNTP's (1mM)	0,5µl
Taq-Polymerase (Ampli-Taq 5U/µl)	0,3µl
3'-Primer (20pmol/µl)	1,0µl
5'-Primer (20pmol/µl)	1,0µl

Es wurde jeweils ein Ansatz mit *Cbfa1* und *HPRT* und den jeweiligen Negativ-Kontrollen mit den unten aufgeführten Primersequenzen (Tab.3.4 ) angesetzt.

Tab. 3.4 Die Sequenzen der eingesetzten Primer:

<i>Cbfa1</i> Forward	5'-GGG AGG ATT TGT GAA GAC GGT-3'
Reverse	5'-CGA TCT GAG ATT TGT GGG CC-3'
<i>HPRT</i> Forward	5'-AGG AAA GCA AAG TCT GCA TTG TT-3'
Reverse	5'-GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT TTA A-3'

Tab. 3.5 Temperaturprogramm des Thermocyclers zum Schreiben der DNA

<u>Vorgang:</u>	<u>Temperatur:</u>	<u>Zeitdauer:</u>	<u>Anzahl der Zyklen:</u>
Denaturierung	95°C	6 min	1
Denaturierung	95°C	20 s	55
Annealing	61°C	30 s	
Extension	73°C	30 s	
Extension	73°C	7 min	1

Im Anschluß wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 3.4.2 Isolierung und Aufreinigung von RNA

Die Isolation der RNA aus den Chondrozyten erfolgt durch Lyse der Zellen mit 200µl β-Mercaptoethanol und des Rneasy Mini Kit® der Firma Quiagen. Dabei wurden die Proben mit 350µl 70% Ethanol homogenisiert, in ein Spin Colum überführt und die Probe für 15 sek. bei 10 000 U/min zentrifugiert. Das Spin Colum wurde nun zweimal mit 350µl RW1-Puffer für 15 sek. bei 10 000 U/min zentrifugiert. Zwischen diesen Waschvorgängen wurde ein DNase-Verdau mit DNase I

Stock Solution durchgeführt, im Anschluß daran wurde zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen, einmal für 15 sek. bei 10 000 U/min und das zweite mal für 2 min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, um das im Spin Colum befindliche Gel mit der RNA zu trocknen. Danach wurde das Gel mit 40µl Rnase free water 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min. bei 10 000 U/min zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde entweder anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei –70°C eingefroren.

### 3.4.3 Reverse Transkription

Aus der aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Dabei mußte darauf geachtet werden, die sehr instabile RNA möglichst auf Eis zu lagern. Es wurden 3µl RNA eingesetzt, in ein 0,5ml Eppendorf Hütchen pipettiert und bei 70°C im Thermoblock für 10min. denaturiert ( Tab.3.6).

Tab 3.6 Denaturierung der RNA

Stufe 1	18°C	1 min.
Stufe 2	70°C	10 min.
Stufe 3	4°C	Hold

Danach wurde der Probe der Mastermix zugegeben.

Tab. 3.7 Mastermix zum Schreiben der cDNA

Reagenzien	Volumen für 20µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	7,5µl
MgCl <sub>2</sub> (5mM)	4,0µl
10x PCR Puffer-II ohne MgCl <sub>2</sub>	2,0µl
dNTP's (1mM)	1,0µl
Random Hexamer Primer (2,5U/µl)	1,0µl
RNase-Inhibitor (1U/µl)	0,5µl
Reverse Transkriptase (2,5U/µl)	1,0µl

Für die Negativ RT-Kontrollen wurde anstelle der Templates und reversen Transkriptase RNase-free H<sub>2</sub>O zugegeben und mit den Proben im Thermoblock mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 3.8 die cDNA synthetisiert. Die Proben wurden nach dem Hold sofort weiterverarbeitet oder bei –20°C eingefroren.

Tab. 3.8 Das Temperaturprogramm zum Schreiben der cDNA

Initiale Denaturierung	20°C	10min
Amplifikation	43°C	1h 15m in.
	99°C	5min.
Hold	04°C	

## 3.5 Quantitative Real-Time-PCR

### 3.5.1 Einführung

Die Entwicklung der quantitativen Real-Time-PCR ( qrt-PCR) ( Heid et al., 1996) ist auch für diese Arbeit eine wichtige Grundlage zur Auswertung der Daten denn es ist mit ihrer Hilfe möglich, mit geringem Aufwand quantitative Ergebnisse für die Templatemengen zu erzielen. Mittlerweile wird die qrt-PCR als eine Standard - Methode zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren angesehen ( Orlando et al., 1998, Giulietti et al., 2001, Overbergh et al., 2003).

Innerhalb der einzelnen auszuwertenden Proben in dieser Arbeit handelt es sich um geringe Mengen an isolierter mRNA, die vor Messung im Real-Time Automaten (Taqman®) in einem ersten Schritt noch in cDNA geschrieben werden mußten. Wie bei der konventionellen PCR wird auch hier auf eine Amplifikation der zu messenden Sequenzen gesetzt. Neben der quantitativen kompetitiven PCR (Gilliand et al., 1990) und der limitierten Verdünnungstechnik ( Sykes et al., 1992; Villarreal et al., 1991 ) bietet die qrt-PCR im Vergleich dazu ein einfaches Verfahren, bei dem die Nukleinsäuren innerhalb der gesamten Reaktion gemessen werden können. Der Einsatz von Fluoreszenztechniken bietet die Möglichkeit, anhand der Veränderung der Fluoreszenz auf eine Veränderung des Reaktionsproduktes zu schließen (Higuchi et al., 1993; Fink et al., 2000, 2002), d h. die Produktzunahme wird gemessen.

In dieser Arbeit wurde eines der möglichen Real-Time Verfahren, die sogenannte Hydrolysesonde, verwendet. Sie besteht aus einer zur Zielsequenz komplementären Basensequenz, die heute anhand von Programmen optimiert werden kann, einem Reporterfarbstoff am 5´ terminalen Ende dem 6 – FAM ( 6 – Carboxy – Fluoreszein ) und einem Quencherfarbstoff am 3´ terminalen Ende dem TAMRA ( 6 – Carboxy – tetramethyl – rodamin ) (Holland et al., 1991; Gibson et al., 1996; Wilhelm und Pingoud, 2003), die zu den üblichen PCR-Reagenzien der Reaktion zugegeben wird. Zusätzlich wurden der PCR ein Vorwärts- und ein Rückwärts Primer, die spezifisch für die zu amplifizierende Sequenz sind, zugegeben. Zur Anregung dient Licht eines Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488nm. Die Fluoreszenz wird bei intakter Sonde durch die räumliche Nähe von Quencher und Reporter durch einen sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) oder nach dem Dexter-

Mechanismus von dem Reporter auf den Quencher gelöscht. ( Bustin et al.,2000; Wilhelm und Pingoud, 2003).

Während der Annealing-Phase bindet die Sonde an die entsprechende, komplementäre Sequenz innerhalb der DNA, die sich zwischen den Primerbindungsstellen befindet. Während der PCR werden die Primer mittels der Taq – Polymerase so lange verlängert bis sie auf die Sonde treffen. Dort wird die Sonde vom DNA Strang geschert und durch die 5´Nuklease – Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dabei wird der Reporterfarbstoff der Sonde vom Quencher räumlich getrennt, der Quencher fällt aus und das anschließend emittierte Fluoreszenzlicht kann gemessen werden ( siehe Abb. 3.6) (Wilhelm und Pingoud, 2003).

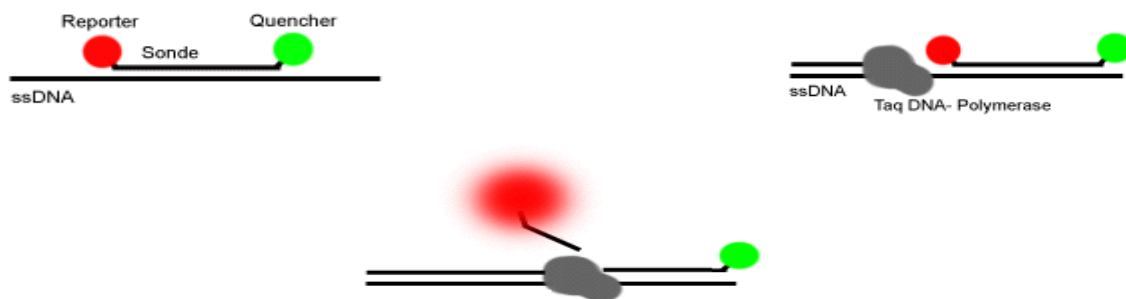


Abb. 3.6 Ablauf des Fluoreszenzverfahrens in Anlehnung an *Wilhelm et al. 2003*

Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten Menge an PCR Produkten.

Nach Beendigung der Messung wird die Kurve logarithmiert und ein geeigneter Punkt aus dem Verlauf als Schwellenwert CT gewählt und wie in 3.5.2 gezeigt zum  $\Delta$ CT Wert berechnet.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß eine möglichen Kontamination durch mehrmaliges Öffnen der Tubes, wie bei einer normalen PCR erforderlich, entfällt. Eine Kontamination bei der Gelaufftrennung wird durch benachbarte PCR Produkte aufgehoben ( Bustin et al., 2002).

### 3.5.2 Berechnung der $\Delta CT$ Werte

Für die Berechnung nutzt dieses Verfahren den Umstand, daß in der exponentiellen Phase der PCR die Amplifikationsseffizienzen näherungsweise konstant sind.

Der CT-Wert ist proportional zum Logarithmus der Templatemenge:

$$CT \propto \log(N_0)$$

Folgende Gleichungen wurden nach der  $2^{-\Delta CT}$  Methode von. zur Berechnung herangezogen (Livak und Schmittgen, 2001):

$T_0$  : (0) Nativ Probe

$T_n$  : Probe zum Zeitpunkt n

$CT_{0,T}$  : CT-Wert von Cbfa1 zum Zeitpunkt 0

$CT_{0,R}$  : CT-Wert von HPRT zum Zeitpunkt 0

$CT_{n,T}$  : CT-Wert von Cbfa1 zum Zeitpunkt n

$CT_{n,R}$  : CT-Wert von HPRT zum Zeitpunkt n

Die  $\Delta CT$ -Werte beschreiben das Verhältnis der logarithmierten Templatemengen von Test- und Referenzgen:

$$\Delta CT (T_0) = CT_{0,T} - CT_{0,R} \quad 1.1.$$

$$\Delta CT (T_n) = CT_{n,T} - CT_{n,R} \quad 1.2.$$

Der  $\Delta\Delta CT$ -Wert ist das auf den „Kontrollwert“ ( $T_0$ ) normalisierte Verhältnis:

$$\Delta\Delta CT(T_n) = \Delta CT(T_n) - \Delta CT(T_0) \quad 1.3.$$

Die relative Veränderung der normalisierten Templatemenge des Testgens ergibt sich durch die Potenzierung des  $\Delta\Delta CT$ -Werts zur Amplifikationseffizienz als Basis, die üblicherweise mit 2 ( $\cong 100\%$ ) angenähert wird:

$$\xi = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad 1.4.$$

### 3.5.3 Durchführung der qrt-PCR

Die qrt-PCR wurde unter folgenden Standard Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tab. 3.9 Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qrt-PCR

Template- cDNA	3,0µl
Vorwärts- Primer	4,5µl (950µM)
Rückwärts- Primer	4,5µl (950µM)
Hydrolysesonde	1,0µl (100µM)
H <sub>2</sub> O	12,0µl
2x qPCR™ Puffer	<u>25,0µl</u>
Total	50,0µl

Der qPCR™ (2x Reaktions Puffer, Eurogentec) beinhaltet als Fertigmischung:

dNTP (1mM)

Hot Goldstar DNA Polymerase

MgCl<sub>2</sub> (5mM)

Uracil-N-glykosidase.

Tab 3.10 Die Sequenzen der Hydrolysesonden für die Analyse der qrt-PCR

Cbfa1-Taq Man 5'FAM-TGA-AAC-TCT-TGC-CTC-GTC-CAC-TCC-G-TAMRA3'

HPRT-Taq Man 5'FAM-CCA-GTG-TCA-ATT-ATA-TCT-TCC-ACA-ATC-AAG-AC-TAMRA3'



Tab 3.11 Die Primer Sequenzen

Cbfa1-Forward	5'-GGG-AGG-ATT-TGT-GAA-GAC-GGT-3'
Cbfa1-Rerward	5'-CGA-TCT-GAG-ATT-TGT-GGG-CC-3
HPRT-Forward	5'-AGG-AAA-GCA-AAG-TCT-GCA-TTG-TT-3'
HPRT-Reward	5'-GGT-GGA-GAT-CTC-TCA-ACT-TTA-A-3'

Tabelle 3.12 Das Temperaturprogramm zur Durchführung der qrt-PCR

Initiale Denaturierung	1x	50°C	2min.
		95°C	6min.
Amplifikation	45x	95°C	20 Sek.
		59°C	30 Sek.
		73°C	30 Sek.
Hold		25°C	

### 3.6 Gelelektrophoretische Größenfraktionierung der amplifizierten DNA

Mit Hilfe der Methode der Gelelektrophorese ist es möglich, unterschiedlich große DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix ihrer Größe nach zu trennen. Dabei wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Während dieses Vorgangs entscheidet die Größe der DNA- Moleküle, die angelegte Spannung und die Porengröße des Gels über die Fraktionierung der Fragmente. Kleinere Moleküle wandern schneller als große. Durch das gleichzeitige Aufbringen eines Markers  $\Phi$ X174 DNA/ *HINF I* , der ein Spektrum von 20 DNA- Fragmenten in der Größe von 24 – 726bp abdeckt, lässt sich die Größe der Fragmente abschätzen.

Für die Durchführung wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde für unsere Gelkammer ( Biorad) 1,3g Agarose in 60ml 0,5 x TBE- Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlen auf ca. 50°C das Gemisch mit 1,5 $\mu$ l Ethidiumbromid vermischt und in die Gelkammer gegossen. Je nach Probenumfang wurde ein Kamm mit 20 oder 35 Zähnen gesteckt. Nach Aushärten wurden das Gel und die Elektroden mit 0,5x TBE- Puffer beschichtet.

Das PCR Produkt wurde mit 7 $\mu$ l Ladepuffer homogenisiert und ca. 8 $\mu$ l DNA- Laufpuffer-Gemisch in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V und 300 mA getrennt bis ca. 2/3 des Gels durchlaufen wurde. Das Bandenmuster lässt sich durch Auflage auf eine UV-Quelle (312nm) darstellen. Das Ethidiumbromid wird in die DNA interkaliert und durch das UV- Licht zur Fluoreszenz angeregt. Das Gel wurde mit einer Polaroid Kamera fotografiert ( Film Polaplan; Blende 11; Belichtungszeit 2\*1/8 sek.).

### **3.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die statistische Auswertung der Dateien erfolgte mit Hilfe von SPSS® Vers. 12.0 und Exel ® 2000.

Es wurden für alle Daten explorative Datenanalysen mit Boxplotdiagrammen erstellt. Zur Prüfung der Abhängigkeiten der Ergebnisse wurden alle Datenanalysen mit dem ANOVA ( Analyse der Varianz zwischen Gruppen) Test und dem LSD ( kleinste quadratische Abweichung) Untertest durchgeführt.

Es wurde die Abhängigkeit der Konzentration von der Wachstumsdauer beobachtet. Statistisch signifikante Differenzen wurden durch ein festgelegtes Signifikanzniveau von  $\alpha=5\%$  ( $p<0,05$ ) festgelegt.

Die weitere grafische Aufarbeitung und Darstellung erfolgte unter Zuhilfenahme von Exel ® 2000.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Proliferationsversuche

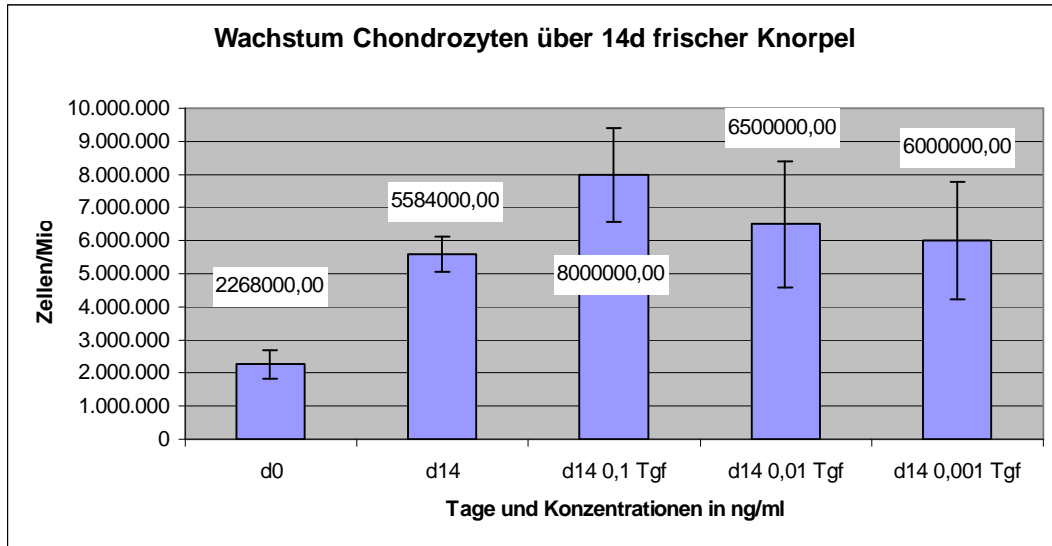


Abb. 4.1 Wachstumstest über 14 Tage mit frisch isolierten Chondrozyten in Monolayerflaschen. Die Kultivierung erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen  $TGF-\beta 1$  wie sie in der Literatur zum Einsatz kommen.

Die Zellzählung erfolgte am Anfang und am Ende der Kultivierungsdauer. Augenscheinlich läßt sich über den Kultivierungsverlauf in Abb. 4.1 ein deutlicher Einfluß von  $TGF-\beta 1$  auf die Chondrozyten erkennen. Mit der stärksten Konzentration von  $TGF-\beta 1$  befinden sich nach Ablauf der Zeit ca. 2,5 Mio. mehr Zellen in der Kulturflasche als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in den geringeren Konzentrationen wird ein Effekt sichtbar.

Im Unterschied dazu stellt sich Abb. 4.2 dar. Bei einem am Ende der dritten Passage durchgeführten MTT-Elisa-Test zeigt sich im Wachstumsverlauf über 10 Tage ein inhibitorischer Effekt des  $TGF-\beta 1$  auf die Chondrozyten. Die Chondrozyten sind zu diesem Zeitpunkt schon über 210 Tage kultiviert worden. Nach ca. 5 Tagen der Wachstumsperiode steigt die Zellzahl der Kontrollgruppe deutlich im Vergleich zu den Konzentrationen mit  $TGF-\beta 1$  an.

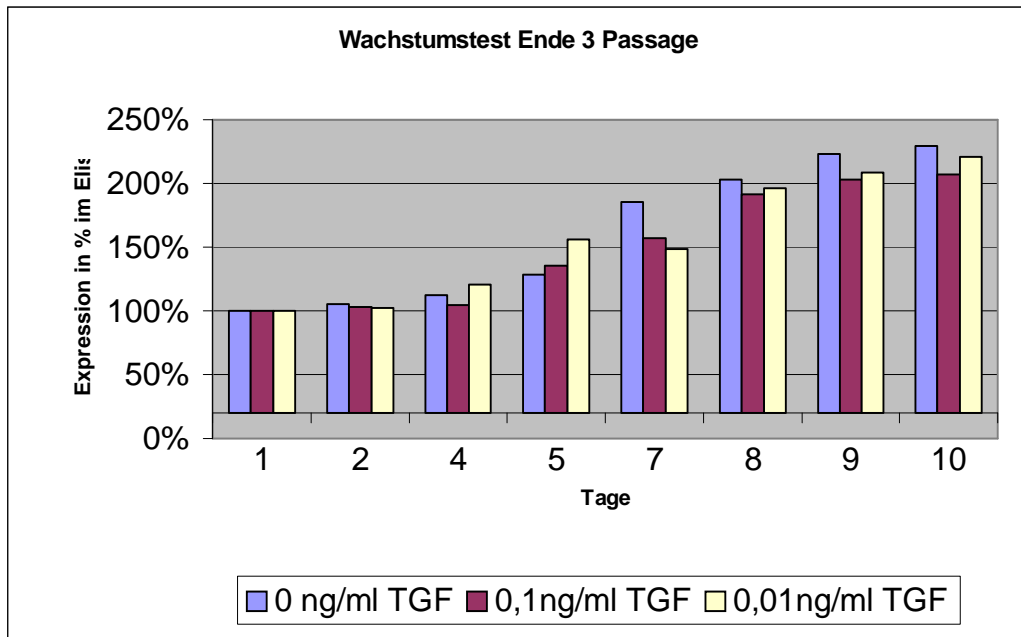


Abb. 4.2 Wachstumstest nach Ende der dritten Passage mittels MTT-Elisa-Test. Kultivierungsdauer nochmals 10d. Die unterschiedlichen Farben der Balken sind jeweils den Konzentrationen zugeordnet.

## 4.2 Monolayerpassagen mit Messung der *Cbfa1* Expression

Berechnung der *Cbfa1* Expression über die Wachstumsdauer von 42 Tagen und drei Passagen in Monolayerkultur. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben mit einer Kontrollgruppe und jeweils 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml *TGF-β1* behandelt. Deutlich erkennbar ist schon nach 14 Tagen die um das doppelte erhöhte Expression des *Cbfa1* innerhalb der Kontrollgruppe auf 203% und bis zum Ende der Wachstumsdauer ein Anstieg auf 272% der Ausgangsexpression.

Innerhalb der 0,1 ng/ml *TGF-β1* Gruppe zeigt sich das gleiche Bild nach 14 Tagen eine 145% Expression des *Cbfa1* und nach 42 Tagen der weitere Anstieg auf 199% der Ausgangsexpression.

Interessant innerhalb der Monolayerkulturen ist die 0,01 ng/ml *TGF-β1* Gruppe, die wie die anderen einen stetigen Anstieg der *Cbfa1* Expression über die Kultivierungsdauer auf 151% am Ende zeigt. Allerdings augenscheinlich mit einer höheren Inhibition des *Cbfa1* im Vergleich zur höchsten *TGF-β1* Konzentration.

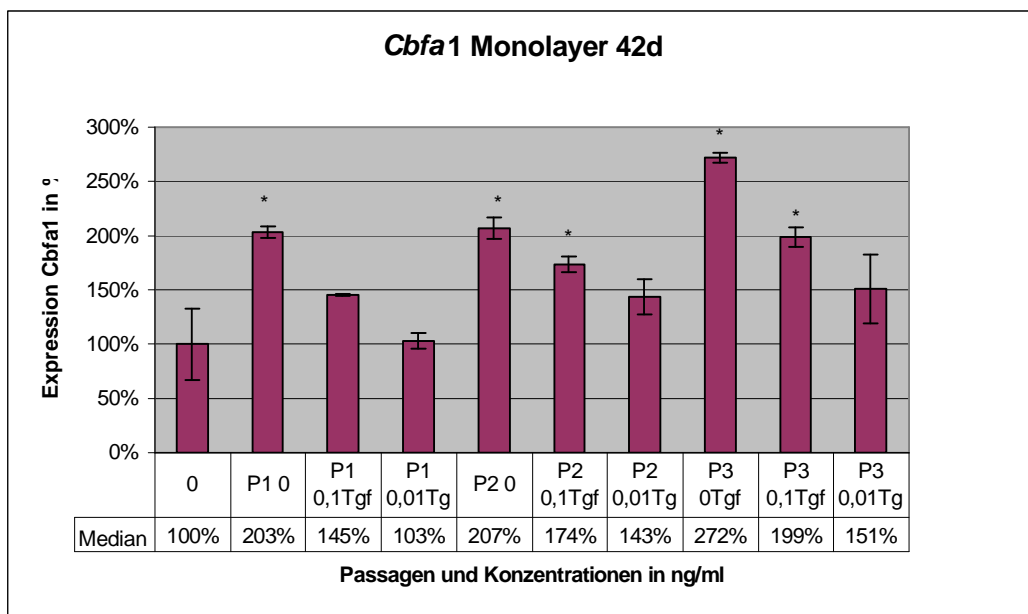


Abb. 4.3 Wachstum von Chondrozyten über drei Passagen und mit zwei verschiedenen Konzentrationen *TGF-β1*.

### 4.3 Messung der Cbfa1 Expression über 3 Passagen in Alginat

#### Auswertung für die Passage 1

Die Kultivierung, Konzentration und Probennahme in Passage 1 wurde wie in 3.3.3 und 3.3.5 beschrieben durchgeführt.

Über die Kultivierungsdauer steigt die Expression des *Cbfa1* innerhalb der 28 Tage von 100% über 140% nach 14 Tagen auf knapp 611% am Ende der ersten Passage an.

Interessant ist die Entwicklung der Expression des *Cbfa1* innerhalb der beiden *TGF-β1* Kulturen. Nach einem höheren Anstieg der Expressionen nach 14 Tagen auf 417% bzw. 236% über das Niveau der Kontrollgruppe, sinkt nach 28 Tagen die Expression der *TGF-β1* Gruppen auf 219% bzw. 303% deutlich unter das Niveau der Expression nach 14 Tagen. Die Expression der höchsten *TGF-β1* Gruppe beträgt nur  $\frac{1}{3}$  der Endexpression des *Cbfa1* der Kontrollgruppe.

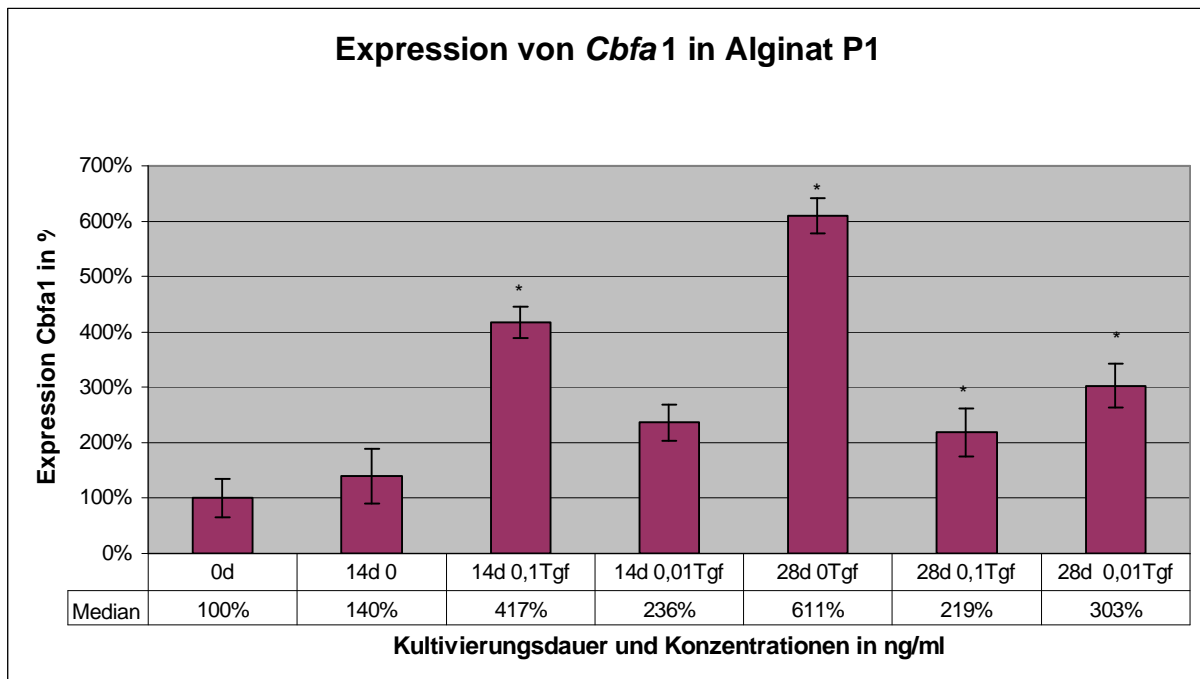
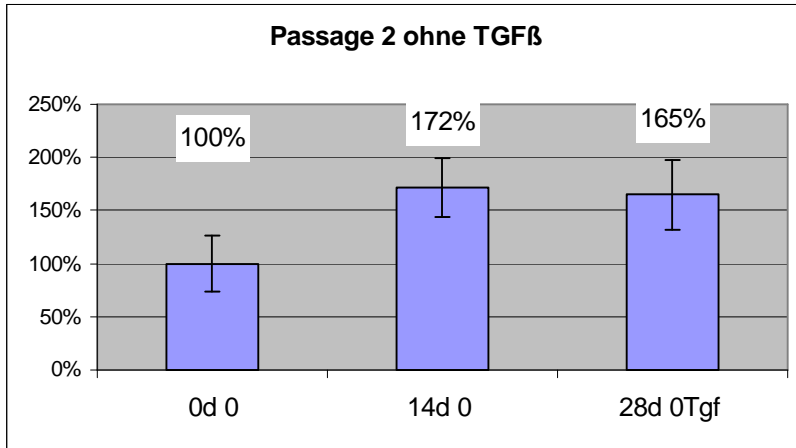
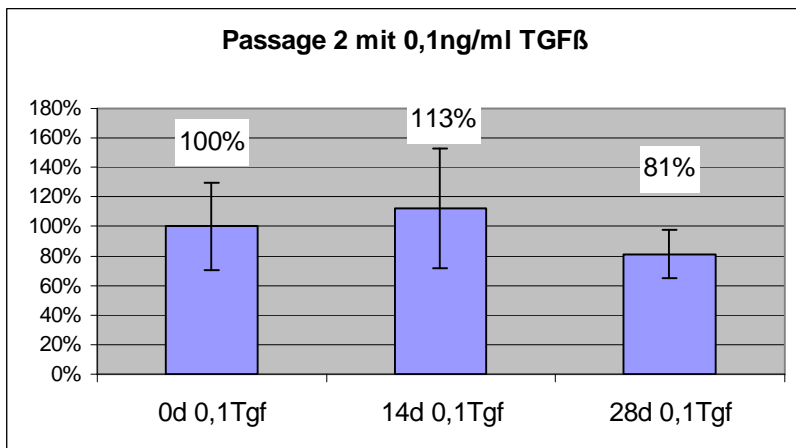
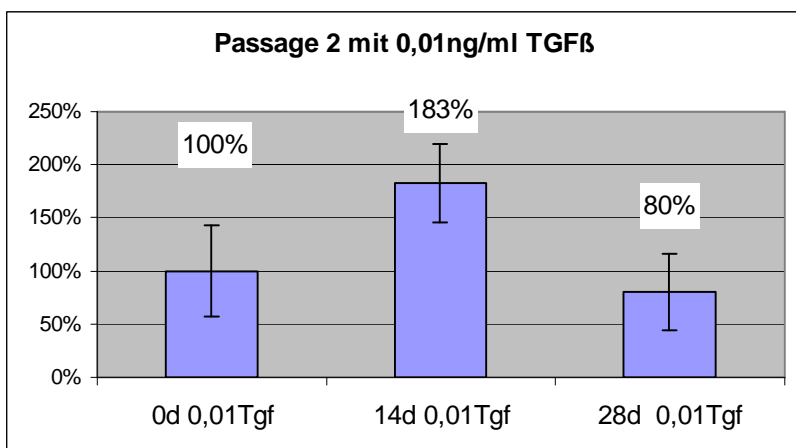


Abb 4.4 Expression des *Cbfa1* in Passage1 in Alginat über 28 Tage.

## Auswertung für die Passage 2

Abb. 4.5 Expression des *Cbfa1* in Passage 2 in Alginate über 28 Tage.Abb. 4.6 Expression des *Cbfa1* in Passage 2 mit 0,1ng/ml *TGFβ1* in Alginate über 28 Tage.Abb. 4.7 Expression des *Cbfa1* in Passage 2 mit 0,01ng/ml *TGFβ1* in Alginate über 28 Tage.



Innerhalb von Passage 2 und 3 treten drei verschiedene 0-Werte auf. Dies entsteht dadurch, daß zwischen Passage 1 und 2 bzw. 2 und 3 die Chondrozyten über 14 Tage in Monolayerkulturen mit der jeweiligen Konzentration *TGFβ1* kultiviert wurden. Die Expressionsveränderungen werden nun innerhalb der jeweiligen Konzentration gemessen.

Es zeigt sich in der Kontrollgruppe (Abb. 4.5) nach einem Anstieg nach 14 Tagen auf 172% ein Abfall auf 165% der Ausgangskonzentration nach 28 Tagen.

In Abb. 4.6 zeigt sich nach einem Anstieg auf 113% und nach 28 Tagen eine Repression auf 81% des Ausgangswertes unter dem Einfluß von *TGFβ1*.

In Abb. 4.7 ein Anstieg nach 14 Tagen auf 183% und wiederum nach 28 Tagen ein Abfall auf 80% der Ausgangsexpression unter dem Einfluß von *TGFβ1*.

## Auswertung für die dritte Passage

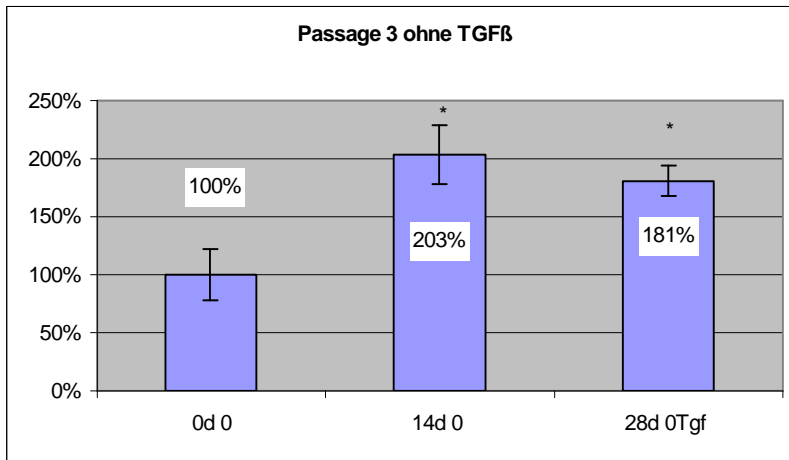


Abb. 4.8 Expression des *Cbfa1* in Passage 3 in Alginat über 28 Tage.

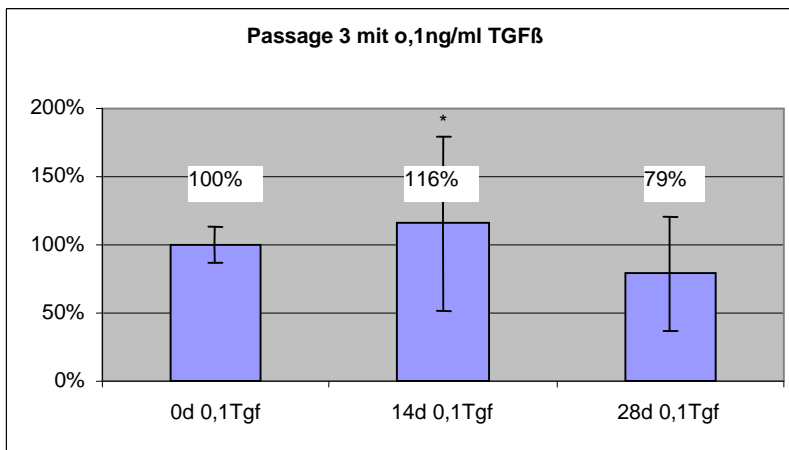


Abb. 4.9 Expression des *Cbfa1* in Passage 3 mit 0,1ng/ml TGF $\beta$ 1 in Alginat über 28 Tage.

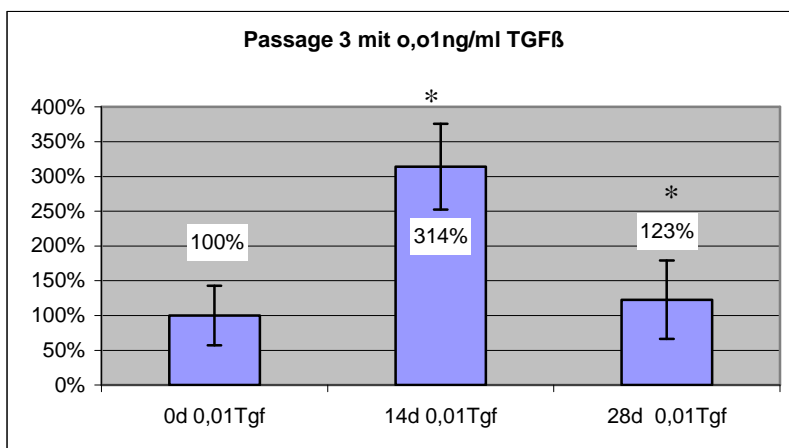


Abb. 4.10 Expression des *Cbfa1* in Passage 3 mit 0,1ng/ml TGF $\beta$ 1 in Alginat über 28 Tage.

Das gleiche Bild wie unter Passage 1 ein stetiges Ansteigen der Kontrollgruppe (Abb. 4.8) auf 203% der Ausgangsexpression nach 14 Tagen und der Abfall auf 181% nach 28 Tagen.

In der 0,1ng/ml *TGF- $\beta$ 1* Gruppe in Abb. 4.9 ein Anstieg an Tag 14 auf 116% und ein erneuter Abfall auf 79% nach 28 Tagen unter dem Einfluß von *TGF $\beta$ 1*.

In der 0,01ng/ml *TGF- $\beta$ 1* Gruppe in Abb. 4.10 ein Anstieg an Tag 14 auf 314% und nach 28 Tagen auf 128% des Ausgangswertes unter dem Einfluß von *TGF $\beta$ 1*.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 *TGF $\beta$ -1*

Die sehr unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse erschweren einen Vergleich zwischen den Studien, allerdings läßt sich ganz allgemein feststellen, daß *TGF- $\beta$*  auf jüngere Chondrozyten einen höheren proliferativen Effekt zeigt (Blumenfeld et al., 1997), während bei älteren ein proliferationshemmender Effekt erreicht werden kann (Blanko et al., 1995). *TGF- $\beta$*  scheint eine altersabhängige Konzentration innerhalb des menschlichen Körpers zu haben. Es konnte nachgewiesen werden, daß die *TGF- $\beta$*  Konzentration mit zunehmendem Alter in der Gelenkflüssigkeit abnimmt, aber gleichzeitig ein Anstieg in osteoarthrotischen Gelenken zu verzeichnen ist (Wie und Messner, 1998).

Ein, auch für diese Arbeit, interessanter Aspekt gilt der Fähigkeit von *TGF- $\beta$ 1* einen gewissen inhibitorischen Effekt auf die Osteogenese ausüben zu können und bedingt dadurch die Dedifferenzierung von Chondrozyten zu verlangsamen (Zellin et al., 1998). *TGF- $\beta$ 1* scheint bei Osteoarthrose mit vermehrter Expression dem destruktiven Prozess entgegenzuwirken. Bei der Beurteilung muß jedoch beachtet werden, daß in mehreren Studien zum Teil widersprüchliche Aussagen bezüglich des proliferativen Effektes von *TGF- $\beta$ 1* getroffen wurden. Offensichtlich besteht eine Abhängigkeit des proliferativen Ergebnisses von den vorgefundenen Kulturbedingungen. Denn Faktoren wie die Zusammensetzung des Kulturmediums, die Form der Kultivierung ( in Monolayer- oder dreidimensionalen Kulturen), das Alter des Patienten und infolgedessen auch das der Chondrozyten. Gleichzeitig scheinen die Kultivierungsdauer und der Grad der Vorschädigung der Chondrozyten die Ergebnisse mit *TGF- $\beta$ 1* in unterschiedlichster Weise zu beeinflussen.

Beobachtet man das Wachstumsverhalten von Chondrozyten unter *in vitro* Kulturbedingungen, so kann nachgewiesen werden, daß der totale DNA-Gehalt von Chondrozyten in dreidimensionalen Kultivierungssystemen die Proliferation der Chondrozyten unter Zugabe von *TGF- $\beta$ 1* und fetalem Kälber Serum (FCS) zunimmt,

wohingegen unter serumfreien Konditionen die Proliferationstätigkeit abnimmt (Fortier et al., 1997).

Es ist zu beachten, daß nicht nur die Passagendauer, sondern auch die Phase des Zyklusses, in dem sich die Zelle zum Zeitpunkt der Stimulation befindet einen Einfluß auf die Proliferation hat. So zeigten Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum unter Einfluß von *TGF- $\beta$ 1*, wohingegen bei Zellen, die sich in der S-Phase befanden, eine hohe Stimulationsrate nachgewiesen werden konnte (Vivien et al., 1990).

Mittlerweile liegen Ergebnisse zahlreicher in vivo Studien vor, bei denen über mehrere Wochen *TGF- $\beta$*  intraartikulär injiziert wurde. Hierbei zeigte sich, daß innerhalb eines kurzen Zeitraumes und einer Injektionsdauer von weniger als drei Wochen die Zahl der hypertrophen Zellen deutlich abnahm (Hulth et al., 1996), die Knochen und Knorpelstruktur gefestigt wurde und die Kollagen Typ II Expression (Critchlow et al., 1995) und die Proteoglykansynthese zunahm (Glansbeek et al., 1998). Allerdings wurde als negativer Effekt bei einer Injektionsdauer von mehr als drei Wochen die Ossifikation zerstört (Hulth et al., 1996) und die Proteoglykansynthese gehemmt.

Ferner ist *TGF- $\beta$*  nicht nur für die Chondrogenese einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren, sondern scheint auch im Rahmen der Osteogenese eine ähnliche Rolle zu spielen. So wurde in einer Studie nachgewiesen, daß *TGF- $\beta$*  mit der BMP-7 ein schnelles Knochenwachstum initiieren kann (Ripamonti et al., 1997). Allerdings erbrachte eine andere Studie den Nachweis, daß *TGF- $\beta$ 1* sowohl die Chondrogenese als auch die Osteogenese inhibiert und gleichzeitig zu einer Matrixkalzifizierung führt (Scheijmans et al., 1996).

Insgesamt kann nach dem heutigen Stand der Forschung davon ausgegangen werden, daß *TGF- $\beta$*  innerhalb der Chondrogenese und Osteogenese in ein kompliziertes Netzwerk von Regulationsmechanismen eingebettet ist. Die Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß *TGF- $\beta$*  über seine Rezeptorvermittlung sowohl den Erhalt des kartilaginären Phänotyps ermöglicht und die Chondrozytenreifung fördert (Ferguson et al., 2000) als auch die chondrogene Differenzierung der Zellen aufrechterhält (Schwartz et al., 1996). Weiterhin sorgt der Einfluß von *TGF- $\beta$ 1* für eine Erhöhung der Produktion von Matrixproteinen (Sylvia et al., 2000, Schwartz et al., 1998) und der Kollagen II Synthese.

Die Veränderung der Proliferationstätigkeit unter Einfluß von *TGF-β1* konnte innerhalb dieser Arbeit in Vorversuchen eindeutig bestätigt werden. So wurde bei frisch aus Operationspräparaten isolierten Chondrozyten in einem Monolayer Wachstumsversuch unter Einfluß von verschiedenen *TGF-β1*-Konzentrationen eine deutlich erhöhte Proliferationstätigkeit der Chondrozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte *TGF-β1* nach drei Passagen und einer Kultivierungsdauer von 120 Tagen einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Proliferationstätigkeit der Chondrozyten.

## 5.2 *Cbfa1*

Die Verwendung von *Cbfa1* als Expressionsmarker innerhalb der Versuchsreihe erfolgte unter dem Gesichtspunkt seiner Schlüsselfunktion als ein wichtiger Differenzierungsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung (Harada et al., 1999). Mittlerweile rückt die Erforschung der Auswirkung von *Cbfa1* auf Chondrozyten immer mehr in das Blickfeld von experimentellen und klinischen Studien, da nachgewiesen werden konnte, daß *Cbfa1* einer der Hauptfaktoren für die Differenzierung von Chondrozyten ist (Enomoto et al., 2004, Kim et al., 1999). Es wird allerdings immer noch davon ausgegangen, daß die Anwesenheit erhöhter *Cbfa1*-Spiegel eine Indikation für das Vorliegen einer Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten ist (de Crombrughe et al., 2001). Geht man nun davon aus, daß ein hoher *Cbfa1*-Spiegel diese Umwandlung fördert, läßt sich daraus schließen, daß die Osteogenese teilweise durch *Cbfa1* eingeleitet wird.

Weiterhin sprechen die Ergebnisse für die in Monolayer kultivierte Chondrozyten dafür, daß im Laufe der Kultivierungsdauer immer mehr ansteigende *Cbfa1*-Werte auf eine Umwandlung oder Transformation der Chondrozyten zu einem mehr osteoblastären Phänotyp hinweisen (Rabie et al., 2004).

Aus diesem Grund scheint *Cbfa1* ebenfalls nicht nur für diese Studie ein sehr guter Meßfaktor zu sein. Mit seiner Hilfe kann eine Aussage über den Differenzierungsvorgang innerhalb der Chondrozyten ermöglicht werden. In weiteren

Studien konnte nachgewiesen werden, daß die *Cbfa1* Expression von der dreidimensionalen Struktur des artikulären Knorpels abhängig ist ( Battmann et al., 1999).

Das hier in den Ergebnissen gezeigte Verhalten von *Cbfa1* über einen Kultivierungsverlauf im Alginat, läßt durch die Repression von *Cbfa1* somit positive Rückschlüsse auf die Verwendung dieses Verfahrens zu.

### 5.3 Kultivierungssystem

Als Kultivierungssysteme wurden sowohl die Monolayerkultur als auch die dreidimensionale Alginatkultivierung gewählt.

Beide Kultivierungssysteme bieten für die Chondrozytenkultivierung Vorteile. In der Industrie wird heute häufig das Monolayerverfahren angewendet, da es die Möglichkeit bietet, innerhalb kürzester Zeit die Zahl der Zellen zu vermehren. Es ist ein einfach zu handhabendes und elegantes Verfahren, hat allerdings den Nachteil, daß sich die Zellen nach relativ kurzer Zeit zu dedifferenzieren beginnen (Martin et al., 1999). Zellen, die sich in natürlicher Umgebung nur sehr langsam teilen und keinen direkten Zell-Zell Kontakt haben, werden hier explosionsartig vermehrt. Dies hat zur Folge, daß sie sich zu einem mehr fibroblastenähnlichen Phänotyp verändern. Sie verändern nicht nur ihr Aussehen, sondern auch ihren gesamten Metabolismus und die Matrixsynthese (Shakibaei et al., 1995, 1997, Martin et al., 1999). Eine vermehrte Bildung von Proteoglykanen und Kollagen I und III ist nachzuweisen (Liu et al., 1998).

Ziel einer Kultivierung ist es, die phänotypischen Eigenschaften einer Zelllinie zu erhalten. Chondrozyten dedifferenzieren in zweidimensionalen Kulturen sehr leicht zu einem fibroblastischem Zellbild. Das heißt, die Produktion von chondrozytenassoziierten Faktoren (Kollagen Typ II, IX; Keratan Sulfat mit Aggrecan) wird heruntergefahren (Aydelotte et al., 1986, Aydelotte et al., 1992, Eyre et al., 1992) und Faktoren der Chondrozytenfrühphase und Fibroblasten (Kollagen I, III; Vesican) werden nach einiger Zeit vermehrt gebildet.

Auf dieser Grundlage wurden bereits Versuche mit dreidimensionalen Kulturformen durchgeführt, die Chondrozyten in Agarose-Medien gebracht (Bruckner et al., 1989, Aydelotte et al., 1986) und dabei wurde eine relative Beibehaltung ihrer Fähigkeit Proteoglykane zu produzieren beobachtet. Als Weiterentwicklung und auch heute noch als Standard etabliertes Verfahren gilt die Kultivierung in Alginat (Guo et al., 1989, Häuselmann et al., 1992, 1994). Die Studien in diesem Bereich belegen auf vielversprechende Weise, daß es möglich ist den Phänotyp der Chondrozyten über lange Kultivierungszeiträume aufrechtzuerhalten und sie sich mit knorpelspezifischen Faktoren wie Aggrecan, Keratan, Kollagen Typ II und Typ IX umgeben (Guo et al., 1989, Häuselmann et al., 1992, Häuselmann et al., 1994, Mok et al., 1994, Petit et al., 1996, Schulze et al., 2000). Damit konnte erreicht werden, daß die *in vivo* von einer Matrix umgebenen Chondrozyten in Alginatkulturen in ähnlicher Weise eine Matrix bilden. Diese Matrix konnte mit der in Aufbau und Volumen ähnlichen *Vivomatrix* verglichen werden (Häuselmann et al., 1994, 1996, Petit et al., 1996).

Da die Chondrozyten nun einfacher aus ihrer Matrix herausgelöst werden können als *in vivo*, ist es möglich die Chondrozyten mit guten Ergebnissen zu kultivieren und die RNA-Extraktion zu vereinfachen (Adams et al., 1992).

Das auch innerhalb dieser Arbeit verwendete Alginat-System ist eines der möglichen und zugleich anerkannten Verfahren (Kultivierungssysteme), um die Dedifferenzierung von Chondrozyten zu unterdrücken und ihre Redifferenzierung zu fördern. Die Vorteile dieser dreidimensionalen Kultivierungsmethode wurden mittlerweile durch mehrere Studien belegt und unter zu Hilfenahme der verschiedensten Parameter getestet (Yaeger et al., 1997, Denker et al., 1999, Haas und Tuan, 1999, Mello et al., 1999, Jakob et al., 2001, Schulze-Tanzil et al., 2002). Alle bisher durchgeführten Studien untersuchten die Expression anerkannter Faktoren, die die phänotypischen Eigenschaften von Chondrozyten repräsentieren, wie zum Beispiel Kollagen II + X, Aggrecan (Bonaventure et al., 1994, Schulze Tanzil et al., 2002, Barbero et al., 2004).

Gleichzeitig wurden innerhalb dieser Studien Kollagen I und III als Indikatoren für beginnende Dedifferenzierung gemessen und gelten heute als die Standardfaktoren, die zu einer induzierten Dedifferenzierung herangezogen werden.

Wohingegen Kollagen II als Faktor zur quantitativen Bestimmung von differenzierten Chondrozyten verwendet wird.



Es ist also möglich, Chondrozyten nicht nur in ihrem differenzierten Phänotyp zu kultivieren. Sie können einmal dedifferenziert, unter bestimmten Umständen auch wieder redifferenziert werden. Das Potential der Chondrozyten aus der Dedifferenzierung redifferenziert zu werden, konnte nicht nur innerhalb unserer Forschungsgruppe nachgewiesen werden ( Battmann et al., 1999, 2000, 2001, 2003, Nusselt et al., 2003). Es ist also möglich während der Kultivierung die Fähigkeiten der Zellen auszuschöpfen, sich innerhalb ihrer komplexen Strukturen zu anderen Zelltypen und wiederum in den eigenen Phänotyp umwandeln zu können.

Ein entscheidender Faktor ist dabei die sogenannte Plastizität von Chondrozyten.

Diese Hypothese geht davon aus, daß Zellen nicht innerhalb eines bestimmten Stadiums der Differenzierung verbleiben, sondern ihre Differenzierung zu einem anderen Phänotyp verändern können (Barbero et al., 2003).

Daraus ergibt sich, daß sich Chondrozyten in Osteoblasten und Fibroblasten differenzieren und wiederum dedifferenzieren können, da diese eng mit Zellen des chondroiden Phänotypes verbunden sind ( Battmann et al., 2003). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte das Redifferenzierungspotential gekoppelt an das *Cbfa1* bereits nachgewiesen werden ( Nusselt et al., 2003, Walz et al., 2004).

#### 5.4 Allgemeine Diskussion der Ergebnisse

Ziel einer Therapie soll die Genesung des Patienten sein. Die Schwierigkeit besteht darin, zu beurteilen, welche die bestmögliche Therapieform darstellt. Ist es das Ziel, dem Patienten nur zur Schmerzfreiheit zu verhelfen oder soll eine nahezu vollständige Wiederherstellung, auch des zerstörten Knorpelgewebes erreicht werden?

Wenn es nur darum ginge, dem Patienten Schmerzfreiheit oder wenigstens eine Linderung der Schmerzen zu ermöglichen, könnte dies wahrscheinlich durch ein Überdecken des Defektes, sei es mit Periost, Knorpelzylindern, Gel oder Kollagen-Matrices erreicht werden. Denn bereits allein durch das Überdecken der nackten Knochenoberfläche wird ein gewisser Schutz gegenüber Reibung induziert und damit verbunden so der störende Schmerzreiz herabgesetzt.

Allerdings sollte das eigentliche Ziel eines solchen modernen Operationsverfahrens sein, auch die Gesamtintegrität und Funktionalität bis auf Zellebene wiederherzustellen. Für den Patienten wäre es also das erklärte Ziel ihm Knorpelzellen zu entnehmen, schnellstmöglich unter Erhaltung ihres Phänotyps und ihrer Differenzierung zu vermehren, in die entsprechenden Implantationsmedien zu überführen und ihm wieder zu implantieren. Wie vorher bereits erwähnt, ermöglicht das Verfahren in Monolayerkultur die bisher technisch mögliche Vervielfältigung der Zellen. Allerdings mit den angesprochenen Nachteilen der Dedifferenzierung. Es ist außerdem möglich, wie diese Untersuchung zeigt, die Proliferationsrate bei frisch isolierten Chondrozyten unter zu Hilfenahme von *TGF-β1* zu steigern.

Wie verhält es sich nun mit der Dedifferenzierung der Chondrozyten in Monolayerkulturen? Sie wurde innerhalb mehrerer Studien eindeutig nachgewiesen. Allerdings läßt sich auch die Monolayerkultur sehr gut mit *TGF-β1* kombinieren. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, ist innerhalb von Monolayerkulturen ein kontinuierliches Ansteigen des *Cbfa1* über drei Passagen als Ausdruck einer Dedifferenzierung zu beobachten.

Allerdings wird auch in der Monolayer-Kultur unter dem Einfluß von *TGF-β1* eine signifikante Repression erreicht, die sich am Stärksten unter der geringsten Konzentration von *TGF-β1* mit 0,01 ng/ml auswirkt.

Um dieses Ergebnis zu erreichen, stehen bei dieser Konzentration eventuell der proliferative und differenzierungserhaltende Effekt in einem optimalen Gleichgewicht zueinander. Es sollte also eine Kombination des Monolayersystems mit der dreidimensionalen Kultivierungsmethode in Erwägung gezogen werden. So könnten nach einer initialen Vermehrung im Monolayersystem, die sich bereits zu dedifferenzieren beginnenden Chondrozyten in dreidimensionale Kulturen überführt werden. Dies hätte den Vorteil, daß sich bereits dedifferenzierte Chondrozyten in einem zweiten Kultivierungsschritt innerhalb einer annähernd vertrauten Umgebung „ausruhen“ und redifferenzieren können, nachdem sie unter Stress vermehrt wurden. So wird das eigene Potential der Zellen ausgeschöpft, um sich wiederum aus eigener Kraft zu redifferenzieren.

Innerhalb dieser Studie konnte vor in Passage 2 und 3 der in Alginate kultivierten Chondrozyten eine geringe Repression der *Cbfa1* Expression innerhalb der

unstimulierten Gruppe nachgewiesen werden. Noch deutlicher fielen die Ergebnisse für die mit *TGF-β1* Stimulierten Gruppen aus, bei denen über alle Passagen im Alginat eine deutliche Repression von *Cbfa1* aufgezeigt werden kann. Und diese zum Teil unter der Ausgangsexposition der jeweiligen Gruppe lag.

Die in den Passagen 2 und 3 im Ergebnisteil auftretenden *Cbfa*-Expressionen weisen darauf hin, daß innerhalb dieser Passagen eine Stabilisierung des Chondrozytenphänotyps, oder zumindest die Erhaltung ihrer Differenzierung stattfindet. Es kann also von einer Redifferenzierung von Chondrozyten unter dem Einfluss von *TGF-β1* gesprochen werden.

Daraus läßt sich schließen, daß *TGF-β1* unter dreidimensionalen Kulturbedingungen einen besseren Erhalt des Phänotyps ermöglicht, da über die gesamte Dauer der Passagen die *Cbfa1* Expression unter Einfluss von *TGF-β1* unterhalb der 0 Kontrolle bleibt.

So wurde auch die übliche Konzentration in Studien von *TGF-β1* von bis zu 10ng/ml hier auf maximal 0,1ng/ml *TGF-β1* reduziert. Die anfänglich auch mitgetestete Konzentration von 0,001ng/ml *TGF-β1* wurde nach den Ergebnissen der ersten Versuchsreihen verworfen. Es zeigte sich innerhalb der Ergebnisse kein signifikanter Unterschied zur Konzentration mit 0,01ng/ml *TGF-β1*. Die Tests haben somit bewiesen, dass auch mit diesen geringen Konzentrationen von *TGF-β1* eine Wirkung zu erzielen ist und damit zu einem Teil wenigstens die Kosten für Wachstumsfaktoren in der Industriellen Zellzüchtung zu reduzieren.

Mit Hilfe dieser Untersuchung und den bereits geleisteten Forschungen im Bereich der Chondrozytenkultivierung, läßt sich folgendes erkennen:

Um Chondrozyten unter Erhalt ihrer Differenzierung zu kultivieren, ist die dreidimensionale Kultur unabdingbar, da so nachgewiesenermaßen ein Erhalt der Differenzierung zu erreichen ist. Um allerdings eine möglichst hohe Anzahl an Zellen für den Patienten zu züchten, ist es notwendig die Monolayerkultur zu nutzen.

Um eine hohe Zellrate zu erreichen und die Differenzierung der Chondrozyten aufrecht zu erhalten, bietet sich die Kombination beider Systeme an. Es besteht die Möglichkeit, nach Entnahme der Chondrozyten eine rasche Vermehrung durch Ausbringen der frisch isolierten Zellen in Monolayerkulturen mit Beginn der

Dedifferenzierung der Zellen zu erreichen und daran eine Alginatkultivierung anzuschließen, die eine Redifferenzierung des Phänotypes der Zellen bewirkt.

Eine andere Möglichkeit ist, die frisch isolierten Chondrozyten nach Entnahme zum Erhalt ihrer Differenzierung bzw. Phänotypes erst in Alginatkulturen zu überführen. Im Anschluß daran müssen sie in Monolayerkulturen ausgebracht werden um die Zellzahl rasch zu erhöhen. Danach werden sie erneut in Alginatkulturen gebracht um die Redifferenzierung zu erreichen.

Unterstützend zu den bestehenden Kultivierungsarten kann *TGF-β1*, wie gezeigt, einerseits die Proliferationsgeschwindigkeit erhöhen, was zu einer kürzeren Kultivierungsdauer innerhalb der Monolayerkultur führt. Andererseits, wie nachgewiesen, mit seinem differenzierungsstabilisierenden Potential quasi zum Schutz der Dedifferenzierung von Chondrozyten verwendet werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist eine sehr kurze Kultivierungsdauer unter dem Erhalt der Differenzierung von Chondrozyten.

Innerhalb dieser Arbeit konnte nun schon zum bekannten Wirkungspotential von *TGF-β1* auf die Chondrozyten, hier zum ersten Mal ein direkter Einfluß auf *Cbfa1* nachgewiesen werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung von Knorpeldefekten, vermehrt an Hüfte und Knie, nimmt derzeit in der orthopädischen Chirurgie einen immer größeren Stellenwert ein. Es werden mehrere Therapiemöglichkeiten angeboten, die alle primär zum Ziel haben beim Patienten Schmerzen und Entzündungen zu reduzieren und seine Bewegungsfähigkeit wieder herzustellen. Besonderes Augenmerk richtet sich dabei zunehmend auf die sogenannte autologe Chondrozyten Transplantation (ACT), bei der dem Patienten Knorpelzellen entnommen, im Labor vermehrt und ihm schließlich zur Defektdeckung wieder reimplantiert werden. Mit Hilfe dieses „Tissue Engineering“ werden eine Reihe von Verfahren verwendet, um die Knorpelzellen zu vermehren.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Modelle eingesetzt, die sogenannte Monolayer- und die dreidimensionale Alginatkultivierung. Weiterhin wird als Wachstums- und Differenzierungsfaktor *TGF- $\beta$ 1* in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben, um dessen Einfluß auf die Kultivierung von Chondrozyten zu untersuchen. Die Transkription des osteoblastären Differenzierungsfaktors *Cbfa1* wird als Maß für die Neigung der Chondrozyten zu einer Transdifferenzierung (Umwandlung in Osteoblasten) bestimmt.

Humane Gelenkchondrozyten von 17 Patienten wurden nach der Methode von Brittberg (1995) aus Operationspräparaten isoliert und die so gewonnenen Chondrozyten mit DMEM/ Ham's F12 K Medium, 20% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin im Kulturschrank bei einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Es wurden auf Alginat basierende 3D-Kulturen einmal als Kontrollgruppe und mit 0,1 ng/ml und 0,01ng/ml *TGF- $\beta$ 1* angelegt. In regelmäßigen Abständen wurde mittels quantitativer rt-PCR (PE Biosystems 7700) die Expression des *Cbfa1* gemessen. Die Bestimmung der Expression erfolgte im Verhältnis zum Housekeeping Gen HPRT.

Innerhalb der Studie konnte in drei Passagen ein Einfluß von *TGF- $\beta$ 1* auf die *Cbfa1* Expression gezeigt werden. Während bei den ohne *TGF- $\beta$ 1* behandelten Proben *Cbfa1* signifikant anstieg, konnte bei den *TGF- $\beta$ 1* Proben eine sichtbar geringere Expression nachgewiesen werden.

Die in dieser Studie *in vitro* beobachtete Regulation des *Cbfa1* unter Einfluss von *TGF- $\beta$ 1* zeigt, daß es möglich ist, die Dedifferenzierung (Plastizität) von

Chondrozyten zu einem mehr osteoblastärem Phänotyp zu unterdrücken und so die chondrale Differenzierung weitgehend zu erhalten.

In Zusammenhang mit weiteren Wachstumsfaktoren bietet dieses Verfahren eine Möglichkeit für die Erzeugung differenzierter Knorpelzelltransplantate. Diese können so schneller kultiviert werden. Gleichzeitig wird die osteoblastäre Umdifferenzierung verlangsamt.

## 7 SUMMARY

The treatment of cartilage damages, especially in the hip and knee joint, becomes more and more important in orthopaedic surgery. Several therapeutic options are available, all of them aiming to reduce pain and inflammation and to restore the patients mobility. Special attention is increasingly drawn to the so-called autologous chondrocyte transplantation (ACT): cartilage cells are taken from the patient, cultured and reimplanted to cover the cartilage defect. Among the methods of "Tissue Engineering" several ways exist to culture cartilage cells.

In this study we used two models: the so-called monolayer- and the three-dimensional alginate culture. The growth- and differentiation factor *TGF- $\beta$ 1* was added in different concentrations to study its influence on the culture of chondrocytes. The rate of transcription of the osteoblastic differentiation factor *Cbfa* was measured to establish the tendency of transdifferentiation (transformation to osteoblasts) of the chondrocytes.

Human articular chondrocytes taken from 17 patients were isolated from samples obtained at joint surgery as described by Brittberg (1995). The chondrocytes were cultured in DMEM/Ham's F12 K medium supplemented with 20% FCS and 1% penicillin/streptomycin at an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°. Alginate based 3D cultures with added 0.1 ng/ml / 0.01 ng/ml *TGF- $\beta$ 1* were used for the control group.

The expression of *Cbfa1* was measured within regular intervals by means of quantitative rt-PCR (PE Bio Systems 7700). The extent of the expression was determined in proportion to the Housekeeping gene HPRT. An influence of *TGF- $\beta$ 1* on the *Cbfa1* expression was shown within 3 passages. While the samples not treated with *TGF- $\beta$ 1* showed a significant increase of *Cbfa1*, a significant decrease was shown within the *TGF- $\beta$ 1* samples.

This study explored the regulation of *Cbfa1* under the influence of *TGF- $\beta$ 1* *in vitro* and showed that it is possible to suppress the dedifferentiation (plasticity) from chondrocytes to a more osteoblastic-like phenotype and to preserve the enchondrale differentiation in this way. In combination with certain growth factors this method offers a possibility to produce highly differentiated cartilage cell transplants.

These can be cultivated faster, whereas osteoblastic differentiation is slowed down simultaneously.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams ME, Huang DQ, Yao LY, Sandell LJ: Extraction and isolation of mRNA from adult articular cartilage. *Anal Biochem.* 202 (1992): 89-95.
2. Adams ME: Cartilage research and treatment of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 4 (1992): 552-559.
3. Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R: TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* 20 (2001): 2254-2272.
4. Applied Biosystems, Essentials of Real Time PCR 1-8.
5. Aydelotte MB, Schleyerbach R, Zeck BJ, Kuettner KE: Articular chondrocytes cultured in agarose gel for study of chondrocytic chondrolysis. In *Articular Cartilage Biochemistry* New York Raven Press (1986): 235-256.
6. Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE: Heterogeneity of articular chondrocytes. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis* New York Raven Press (1992): 237-249.
7. Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I: Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48 (2003): 1315-1325.
8. Barbero A, Grogan S, Schafer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I: Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis and Cartilage.* 12 (2004): 476-484.
9. Bashad E, Stürz H, Steinmeyer J. Treatment of Chondral Defects by Matrix-Guided Autologous Chondrocyte Implantation (MACI): Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery and Future Perspectives.* Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 49-57.
10. Battmann A, Schaller M, Rose J, Bayer M, Kühling j, Stracke H, Bohle RM, Fink L, Schulz A, Stahl U: Expression of Cbfa1 is dependent on the three-dimensional Tissue Structure in Human Articular Chondrocytes in vitro. *J Bone Min Res* 15 (1999): 39.
11. Battmann A, Schaller M, Fink L, Rose J, Bohle RM, Schulz A, Stahl U: Cbfa1 Expression is upregulated in Human Articular Chondrocytes in vitro: A Model for Regulation? *J Bone Min Res* (2000): 52.



12. Battmann A, Schaller M, Fink L, Rose J, Bohle RM, Schulz A, Stahl U: Regulation of Cbfa1 Expression in Human Articular Chondrocytes in vitro. Osteologie Verlag Hans Huber Bern Göttingen Seattle Toronto 10 (2001): 146.
13. Battmann A, Nusselt T, Walz L, Schaller M, Hendrich CH, Fink L, Haas H, Jürgensen I, Stahl U. Chondrocytes.: Hendrich C, Nöth U, Eulert J. Cartilage Surgery and Future Perspectives. Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 115-123.
14. Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plotz W. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. MMW Fortschr Med. 141 (2000):49-51.
15. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Crit Rev Biochem Mol Biol 26 (1991): 301-334.
16. Bitounis B, Solomon L: Bone death in osteoarthritis. J Bone Joint Surg 72 (1990): 533
17. Blanko FJ, Geng Y, Lotz M: Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression.: J Immunol 154 (1995): 4018-4026.
18. Blumenfeld I, Laufer D, Livine E: Effects of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 alpha on matrix synthesis in osteoarthritic cartilage of the temporo-mandibular joint in aged mice. Mech Ageing Dev 95 (1997): 101-111.
19. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Exp Cell Res. 212 (1994):97-104.
20. Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E: Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. Mutat Res. 87 (1981): 81-142.
21. Brittberg M, Lindahl A, Nilson A: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med. 331 (1993): 889-895.

22. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A: Rabbit articular cartilage defects in the knee with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 342 (1995): 254-269.
23. Bruckner P, Horler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, Spycher MA: Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J Cell Biol.* 109 (1989): 2537-2545.
24. Buckwalter JA, Goldberg VM, Booth F, Eyre D.R: Current Concepts Review, Soft-Tissue Aging and Musculoskeletal Function, *J Bone Joint Surg* 75 (1993): 1533-1544.
25. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 47 (1998): 477-486.
26. Bujia J: Effect of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis in cultured human chondrocytes. *Laryngorhinotologie.* 74 (1995): 444-449.
27. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endoc.* 25 (2000): 169-193.
28. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Jour Mol Endoc* 29 (2002): 23-39.
29. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol.* 159 (1995):265-358.
30. Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA : Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem.* 49 (2001): 1211-1220.
31. Chung KS, Park HH, Ting K, Takita H, Apte SS, Kuboki Y, Nishimura I: Modulated expression of type X collagen in Meckel's cartilage with different developmental fates. *Dev Biol.* 170 (1995): 387-396.
32. Cooper C, Campbell L, Byng P, Croft P, Coggon D: Occupational activity and the risk of hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 55 (1996): 680-682.
33. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE: The expression of collagen mRNAs in normally developing neonatal rabbit long bones and after treatment of neonatal and adult rabbit tibiae with transforming growth factor-beta 2. *Histochem J.* 27 (1995): 505-515.
34. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol.* 13 (2001):721-727.

35. Debrunner AM: Eigenschaften des Gelenkknorpels. Debrunner AM: Orthopädie, Orthopädische Chirurgie, Verlag Hans Huber Bern (1994): 83-85.
36. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS: Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*. 64 (1999): 67-76.
37. Derynck R, Feng XH: TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*. 24 (1997): 105-150.
38. Drenckhahn D: Allgemeine Gelenklehre, Arthrologie. Benninghoff, A. Anatomie Bd. 1,15. Aufl., Urban & Schwarzenberg, (1994): 215-228.
39. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell* 89 (1997): 747-754.
40. Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, Yamana K, Yoshida C, Sumitan, Yamamoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Komori T: *Runx2* deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J Cell Sci*. 117 (2004): 417-425.
41. Eyre D, Wu JJ, Woods P: Cartilage-specific collagens. Structural studies. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis* New York Raven Press (1992): 119-131.
42. Fava R, Olsen N, Keski-Oja J, Moses H, Pincus T. Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. *J Exp Med*. 169 (1989): 291-296.
43. Ferguson AB: The pathological changes in degenerative arthritis of the hip and treatment by rotational osteotomy. *J Bone Joint Surg* 64 (1964):1337.
44. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ: *Smad2* and *3* mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology*. 141 (2000): 4728-4735.
45. Fink L, Knife T, Seeger W, Ermert L, Kummer W, Bohle RM: Immunostaining for Cell Picking and Real-Time mRNA Quantitation. *Am J Pathol*. 157 (2000): 1459-1466.
46. Fink L, Kohlhoff S, Stein MM, Hanze J, Weissmann N, Rose F, Akkayagil E, Manz D, Grimminger F, Seeger W, Bohle RM: cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am J Pathol*. 160 (2002): 81-90.

47. Fortier LA, Nixon AJ, Mohammed HO, Lust G: Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res* 58 (1997): 66-70.
48. Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT: Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg*. 105 (2000): 980-990.
49. Fukumura K, Matsunaga S, Yamamoto T, Nagamine T, Ishidou Y, Sakou T: Immunolocalization of transforming growth factor-beta s and type I and type II receptors in rat articular cartilage. *Anticancer Res*. 18 (1998): 4189-4193.
50. Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda FD, Bianco P, Cancedda R. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Miner Res*. 8 (1994):1239-49.
51. Gentili C, Bianco P, Neri M, Malpeli M, Campanile G, Castagnola P, Cancedda R, Cancedda FD. Cell proliferation, extracellular matrix mineralization, and ovotransferrin transient expression during in vitro differentiation of chick hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells. *J Cell Biol*. 122 (1993):703-12.
52. Ghadially FN: *Fine Structure of Synovial Joints.: A Text and Atlas of the Ultrastructure of Normal and Pathological Articular Tissues*. Butterworth, London (1983).
53. Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Gen Res* 6 (1996): 995-1001.
54. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DANN: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990): 2725-2729.
55. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 25 (2001): 386-401.
56. Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest*. 78 (1998): 133-142.

57. Greenwald AS, Haynes DW: A pathway for nutrients from the medullary cavity to the articular cartilage of the human femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 51 (1969): 747-753.
58. Grelsamer RP: Unicompartemental osteoarthritis of the Knee.: *J Bone Joint Surg* 77 (1995): 278-292.
59. Guo J, Jourdian GW, MacCallum DJ: Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connec Tissue Res* 19 (1989): 277-297.
60. Haas AR, Tuan RS: Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation.* 64 (1999): 77-89.
61. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M: Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 12 (1999): 6972-6978.
62. Harrison MHM, Schajowicz F, Trueta J: Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. *J Bone Joint Surg* 35 (1953): 598-626.
63. Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ: Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix.* 12 (1992): 116-129.
64. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ: Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 107 (1994): 17-27.
65. Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ: Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am J Physiol.* 271 (1996): 742-752.
66. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Gen. Res* 6 (1996): 986-994.
67. Hendrich C, Weber M, Battmann A, Schütze N, Julius C, Zimmermann U. Differentiation of Human and Murine Chondrogenic Cells Encapsulated in Ultra High Viscosity Alginate: Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery*

- and Future Perspectives. Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 171-184.
68. Hemmen B, Archer CW, Bentley G: Repair of articular cartilage defects by carbon fibre plugs loaded with chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 16 (1991):278
  69. Hewitt AT, Kleinman HK, Pennypacker JP, Martin GR. Identification of an adhesion factor for chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci* 77 (1980):385-388.
  70. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechn* 11 (1993): 1026-1030.
  71. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand HD: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 7276-7280.
  72. Honner R, Thompson RC: The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using <sup>35</sup>S injected intravenously. *J Bone Joint Surg Am.* 53 (1971): 742-748.
  73. Hulth A, Johnell O, Miyazono K, Lindberg L, Heinegard D, Heldin CH: Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *J Orthop Res.* 14 (1996): 547-553.
  74. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Rimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T: Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev. Dyn.* 214 (1999): 279-290.
  75. Ito Y: Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor *Pebp2/Cbf*. *Genes to Cell* 4 (1999): 685-696.
  76. Jakob M, Demartean O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I: Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem.* 26 (2001): 368-377.
  77. Junqueira LC, Carneiro J: Knochen. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*, 4. Aufl., Springer Verlag Berlin (1996): 202-208.
  78. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S: Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev.* 80 (1999): 159-170.

79. Kuboki T, Kanyama M, Nakanishi T, Akiyama K, Nawachi K, Yatani H, Yamashita K, Takano-Yamamoto T, Takigawa M: Cbfa1/Runx2 gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo. *Arch Oral Biol.* 48 (2003): 519-25.
80. 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. *J Cell Biol.* 93 (1982): 743-750.
81. Lawrence DA: Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw.* 7 (1996): 363-74.
82. Lee DA, Salih V, Stockton EF, Stanton JS, Bentley G.: Effect of normal synovial fluid on the metabolism of articular chondrocytes in vitro, *Clin Orthop.* 342 (1997):228-238.
83. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC: Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol.* 20 (2000): 8783-8792.
84. Linsenmayer TF, Chen QA, Gibney E, Gordon MK, Marchant JK, Mayne R, Schmid TR: Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: Analysis of mRNAs and proteins. *Development* 111 (1991): 191-196.
85. Liu H, Lee YW, Dean MF: Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochem Biophys Acta* 1425 (1998): 505-515.
86. Livak JK, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time quantitative PCR and the Method. *Methods* 25 (2001): 401-408.
87. Löffler: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Springer Berlin, Heidelberg, New York 3. Auflage (1998); 333-365; 371-380
88. Maetzel A, Makela M, Hawker G, Bombardier C: Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure--a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol.* 24 (1997): 1599-1607
89. Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE: Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain

- the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res.* 15 (1999): 681-688.
90. Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL: TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci.* 593 (1990): 59-72.
  91. Mello MA, Tuan RS: High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35 (1999): 262-269.
  92. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol.* 187 (2001): 265-276.
  93. Mohr W: *Gelenkpathologie.* Springer (2000).
  94. Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ: Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem.* 52 (1994): 33021-33027.
  95. Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K: Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol.* 98 (1984):1572-1579.
  96. Moeller HD, Evans CH: Gene transfer in the treatment of arthritis. *Orthopäde.* 28 (1999): 76-81.
  97. Moeller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, Georgescu HJ, Robbins PD, Evans CH: TGF-beta-1 gene transfer in joint cartilage cells. Stimulating effect in extracellular matrix synthesis. *Orthopäde.* 29 (2000): 75-79.
  98. Morrison C, Gannon F: The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochem Biophys Acta* 1219 (1994): 493-498.
  99. Moskalewski S: The elastogenetic process in transplants and cultures of isolated auricular chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 8 (1981): 171-174.
  100. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65 (1983): 55-63.
  101. Mullis KB: Target amplification for DANN analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48 (1990): 579-582.
  102. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA: *The polymerase chain reaction.* Birkhäuser, Basel, Berlin, Boston (1994).



103. Mundlos S: Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog. Histochem. Cytochem.* 28 (1994): 1-47.
104. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR: Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 89 (1997): 773-779.
105. Niethard FU, Pfeil J: Gelenkerkrankungen. Niethard FU, Pfeil J. MLP Duale Reihe Orthopädie, Hippokrates Verlag Stuttgart (1997): 181-186.
106. Nöth U, Webering I, Kall S, Rackwitz L, Eulert J, Tuan RS. Human Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Characterization and Chondrogenic Differentiation.: Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery and Future Perspectives.* Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 131-140..
107. Nusselt T, Walz L, Fink L, Haas H, Fölsch C, Schulz A, Battmann A: Regulation der Cbfa1 Expression in gesunden und arthrotischen humanen Gelenkchondrozyten. *Osteologie Verlag Hans Huber Bern Göttingen Seattle Toronto* 12 (2003): 26.
108. O'Connor P, Orford CR, Gardner DL: Differential response to compressive loads of zones of canine articular cartilage: micromechanical, light and elektron microscopic studies. *Ann Rheum Dis.* 27 (1998): 414-420.
109. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y: PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (1993): 6859-6863.
110. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M: Developments in quantitative PCR. *ClinChemLabMed* 36 (1998): 255-269.
111. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89 (1997): 765-771.
112. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C: The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.* 14 (2003): 33-43.
113. Padgett RW, Cho SH, Evangelista C: Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling. *Pharmacol Ther.* 78 (1998): 47-52.

114. Padgett RW, Das P, Krishna S: TGF-beta signaling, Smads, and tumor suppressors. *Bioessays*. 20 (1998): 382-390.
115. Palmer JL, Bertone AL: Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet J*. 26 (1994): 263-277.
116. Pangborn CA, Athanasiou KA: Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res*. 23 (2005): 1184-1190.
117. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF: Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res*. 47 (1987): 5875-5879.
118. Peterson L, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Brittberg M. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 331 (1994):889-895.
119. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 374 (2000):212-234.
120. Peterson L: Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT) Biomechanics and Long-Term Durability. *Am J Sports Med* 30 (2002): 2-12.
121. Petit B, Masuda K, D'Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, Morris NP, Uebelhart D, Schmid TM, Thonar EJ: Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Exp Cell Res*. 225 (1996): 151-161.
122. Plumb J: Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods and Protocols* (2003): 165-170.
123. Plumb JA: Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Med*. 88 (2004): 165-169.
124. Poole CA: The Structure and Funktion of Articular Cartilage Matrices. Woessner JF, Howell DS. *Joint Cartilage Degradation*, Marcel Dekker, Inc. NewYork (1993): 1-35.
125. Putz, R.: Knorpelgewebe, In: Benninghoff, A., *Anatomie Bd. 1*, 15. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1994): 160-165.

126. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. De Gruyter Berlin, New York (1994); Auflage 257.
127. Rabie MBA, Tang HG, Hägg U: Cbfa1 couples chondrocytes maturation and enchondral ossification in rat mandibular condylar cartilage. *Arch oral biol* 49 (2004): 109-118.
128. Richter W, Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V. cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 48 (2002):418-429.
129. Ripamonti U, Duneas N, Van Den Heever B, Bosch C, Crooks J: Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res.* 12 (1997): 1584-1595.
130. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB: Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 327 (1990): 145-154.
131. Rudert M, Wirth CJ, Schulze M, Reiss G: Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg.* 117 (1998): 141-146.
132. Rudert M: Chondrocytes and polymer Fleeces. Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery and Future Perspectives.* Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 141-150.
133. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988): 487-491.
134. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath T, Ten Dijke P: Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 14 (1999): 1145-1152.
135. Satake M, Nomura S, Yamaguchi-Iwai Y, Takahama Y, Hashimoto Y, Niki M, Kitamura Y, Ito Y: Expression of the Runt domain-encoding PEBP2 alpha genes in T cells during thymic development. *Mol Cell Biol.* 15 (1995): 1662-1670.

136. Scheijmans CM, Dieudonne SC, PrahI-Andersen B, Burger EH: The influence of transforming growth factor beta 1 on the development of embryonic mouse long bones. *Eur J Orthod.* 18 (1996): 237-43.
137. Schneider U, Gavénis K: Chondrocytes and collagen Gels. Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery and Future Perspectives.* Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 157-164.
138. Schulze M, Kuettner KE, Cole AA: Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models. *Orthopade.* 29 (2000): 100-106.
139. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M: Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res.* 308 (2002): 371-379.
140. Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD: The synergistic effect of TGF beta and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on resting zone chondrocytes is metabolite-specific and mediated by PKC. *Connect Tissue Res.* 35 (1996): 101-106.
141. Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD: The synergistic effects of vitamin D metabolites and transforming growth factor-beta on costochondral chondrocytes are mediated by increases in protein kinase C activity involving two separate pathways. *Endocrinology.* 139 (1998): 534-545.
142. Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ: Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem.* 43 (1995): 1061-1069.
143. Shakibaei M, De Souza P, Merker HJ: Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int.* 21 (1997): 115-125.
144. Shepherd DE, Seedhom BB: Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann Rheum Dis.* 58 (1999): 27-34.
145. Sokoloff L: The pathology of osteoarthritis and the role of aging. The aetiopathogenesis of osteoarthritis. Nuki G. Pitman Medical Publishing Co Ltd, Turnbridge Wells, Kent. (1980): 1-15
146. Song J, Luo S, Fan Y: Effects of static tension-stress and TGF-beta 1 on proliferation of mandibular condylar chondrocytes. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 21 (2003): 61-73.

147. Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S: Role of RUNX genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245 (2002): 95-108.
148. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J: Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13 (1992): 444-449.
149. Sylvia VL, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD: Transforming growth factor-beta1 regulation of resting zone chondrocytes is mediated by two separate but interacting pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1496 (2000): 311-324.
150. Teshima R, Otsuka T, Takasu N, Yamagata N, Yamamoto K: Structure of the most superficial layer of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* 77 (1995): 460-464.
151. Thirunavukkarasu K, Mahajan M, McLarren KW, Stifani S, Karsenty G: Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1* contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with *Cbfbeta*. *Mol Cell Biol.* 18 (1998): 4197-4208.
152. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE: The osteoblast-specific transcription factor *Cbfa1* contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem.* 275 (2000): 25163-25172.
153. Tillmann B: Gelenkknorpel. Tillmann B, Leonhardt H, Töndury G, Ziller K. *Anatomie des Menschen*, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1998): 96-101.
154. Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ: Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 66 (1984): 253-259.
155. Urban JP, Hall AC, Gehl KA: Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 154 (1998): 262-270.
156. van Breuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB: Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 71 (1994): 279-290.
157. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

- geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (2002): 1-12.
158. Vikkula M, Palotie A, Ritvaniemi P, Ott J, Ala-Kokko L, Sievers U, Aho K, Peltonen L: Early-onset osteoarthritis linked to the type II procollagen gene. Detailed clinical phenotype and further analyses of the gene. *Arthritis Rheum.* 36 (1993): 401-409.
159. Villarreal XC, Grant BW, Long GL: Demonstration of osteonectin mRNA in megakaryocytes: the use of the polymerase chain reaction. *Blood* 1991, 78: 1216-1222.
160. Vivien D, Galera P, Lebrun E, Loyau G, Pujol JP: Differential effects of transforming growth factor beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 143 (1990): 534-545.
161. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P: Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 267 (1977): 531-532.
162. Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB: Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 86 (1990): 1976-1984.
163. Walz L, Nusselt T, Fink L, Ross M, Stahl U, Bohle RM, Schulz A, Battmann A: TGF- $\beta$ 1 – verhindert die Dedifferenzierung von Chondrozyten in vitro – ein sinnvoller Cofaktor für das Tissue Engineering?. *Osteologie* 13 (2004): 43.
164. Walz L, Nusselt T, Fink L, Stahl U, Wilhelm J, Bohle RM, Schulz A, Battmann A: TGF $\beta$ 1 prevents dedifferentiation of alginate embedded chondrocytes in vitro. *Cytotherapy* 6 (2004): 299.
165. Wang, Q.; Stacy, T.; Bindr, M. et al. (1996): Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996): 3444-3449.
166. Wedge JH, Wasylenko MJ, Houston CS: Minor anatomic abnormalities of the hip joint persisting from childhood and their possible relationship to idiopathic osteoarthrosis. *Clin Orthop.* 264 (1991): 122-128.
167. Werner A, Arnold J: Transplantation of osteochondral autografts. Hendrich C, Nöth U, Eulert J. *Cartilage Surgery and Future Perspectives.* Springer Berlin, Heidelberg, New York (2003): 57-66.

168. Wie X, Messner K: Age- and injury-dependent concentrations of transforming growth factor beta 1 and proteoglycan fragments in rabbit knee joint fluid. *Osteo Cartil* 6 (1998): 10-18.
169. Wilhelm J, Pingoud A: Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4 (2003): 1120-1128.
170. Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM: Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res*. 237 (1997): 318-325.
171. Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T: Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet*. 32 (2002): 633-638.
172. Zellin G, Beck S, Hardwick R, Linde A: Opposite effects of recombinant human transforming growth factor-beta 1 on bone regeneration in vivo: effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone*. 22 (1998): 613-620.
173. Zent C, Rowley JD, Nucifora G: Rearrangements of the AML1/CBFA2 gene in myeloid leukemia with the 3;21 translocation: in vitro and in vivo studies. *Leukemia*. 3 (1997): 273-278.

## 9 MATERIAL UND REAGENZIEN

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	(Sigma)
0,5ml DNA Hüttchen	(Eppendorf)
1,5ml Collecting Tubes	(QiaagenRNeasy® Protect Mini Kit)
1,5ml Reaktionsgefäß	(Eppendorf)
1,8ml Kryoröhrchen	(Nunc)
10*PCR Puffer - II	(GeneAmp®Applied Biosystems)
10*PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	(GeneAmp®Applied Biosystems)
10ml Glaspipetten	(Hirschmann)
10ml Spritzen	(Braun)
10ml Zentrifugenröhrchen	(Greiner)
20ml Glaspipetten	(Hirschmann)
24 Loch Platten	(Nunc)
25ml Erlenmeyerkolben	(Greiner)
2ml Collecting Tubes	(QiaagenRNeasy® Protect Mini Kit)
2ml Reaktionsgefäß	(Eppendorf)
50ml Zentrifugenröhrchen	(Greiner)
5ml Glaspipetten	(Hirschmann)
70%iges Ethanol	(Riedel de Haën)
96%-100%iges Ethanol	(Riedel de Haën)
Agarose	(MBI Fermentas)
Alginat – Lösung	(Sigma)
Alginic Acid	(Sigma)
Ampli - Taq - Gold	(GeneAmp®Applied Biosystems)
Aqua ad injectabilia	(Braun)
Auflösepuffer	(Merck)
CaCl <sub>2</sub> – Lösung	(Merck)
CaCl <sub>2</sub> M 110, 99	(Merck)
Cellulose-Acetat Filter 0,2 µm	(Sartorius)
Collagenase Type XI	(Sigma)
Deoxyribonuclease	(Sigma)
DMEM/Ham's F-12 K	(Biochrom AG)



DMSO - Dimethylsulfoxid	(Merck)
Dnase I stock solution	(Qiagen)
dNTP	(Eurobio)
EDTA Ethylendinitrotetraessigsäure M 372,24	(entpr. TRIPLEX®     Merck)
Ethidiumbromid	(Sigma)
Fetal Bovine Serum	(Sigma)
Gelkammer	(Bächler Tech)
Glasfaser Vorfilter	(Sartorius)
Handschuhe	(Kimberly-Clark)
Hank's	(Biochrom AG)
Hinf I - Markers	(Promega)
Isotone Kochsalzlösung	(Baxter)
Kanülen Durchmesser: 20G*1½", 0,9*40	(Terumo)
Kanülen Durchmesser: 24G*1", 0,55*25	(Terumo)
Kühl-Tischzentrifuge 5417 R	(Eppendorf)
Kühlzentrifuge Rotanta/TRC	(Hettich)
Kulturflaschen	(BD Falcon)
Ladepuffer	(Sigma)
MgCl <sub>2</sub>	(Roche)
Minisart Sterilfilter 0,2 µm	(Sartorius)
Multipipette	(Eppendorf)
Multipipettenspitzen 12,5ml	(Brand)
Na-Citrat M 294,1	(Merck)
NaCl M 58,44	(Carl Roth GmbH+Co)
Natronlauge	(Merck)
PCR - Cyclor	(Tuchdown (ThermoHybaid))
Penicillin/Streptomycin	(Biochrom AG)
Petrischalen (Glas)- Durchmesser: 8,5cm	(Schott)
Pinzetten steril	(Angiokard)
Pipet-Boy	(Integra Bioscience)
Pipette 1000µl	(Eppendorf)
Pipette 100µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 1000µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 100µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 10µl	(Eppendorf)

Primer cbfa1 FW	(MWG Biotech AG)
Primer cbfa1 RV	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT FP	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT RP	(MWG Biotech AG)
Random Hexamers	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RDD Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Reverse Transkriptase	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RLT-Lysepuffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Rnase free water	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RNase Inhibitor	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RNeasy Mini Column	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RPE Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RW1 - Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Skalpelle steril	(Feather)
Sterilfilter Porengröße: 0,20µm	(Sartorius)
TBS – Puffer	(Sigma)
Thermocycler	(TRIO-Thermoblock (Biometra))
Tischzentrifuge Biofuge A	(Heraeus)
Transforming Growth Factor beta 1	(Sigma)
Trypsin	(Gibco)
Vortexer: Minishaker MS 1	(Roth)
Wasserbad	(Mettler)

## 10 DATENTABELLEN

Auflistung der verwendeten Proben für die Monolayer und Alginatpassagen

Probe	Geschlecht	Alter	Lokalisation
871	M	49	Femur
872	W	50	Femur
873	M	58	Femur
875	W	59	Tibia
877	M	67	Femur
878	M	71	Tibia
879	W	74	Femur
881	W	70	Femur
883	M	80	Femur
884	W	73	Tibia
889	M	75	Femur
895	M	34	Tibia
896	W	77	Femur
897	W	68	Femur
908	W	45	Femur
910	W	49	Femur
913	W	69	Femur

## 10.1 Proliferationsversuche

## Wachstumstest über 14 Tage

Probe	871	872	873	Mittelwert	Median	STAB
d0	2268000	2274000	1360000	1967333,33	2268000,00	429456,5041
d14	6200000	4900000	5584000	5561333,33	5584000,00	530964,7404
d14 0,1 Tgf	8959000	5585000	8000000	7514666,67	8000000,00	1419537,5616
d14 0,01 Tgf	8000000	3400000	6500000	5966666,67	6500000,00	1915434,3865
d14 0,001 Tgf	7704000	3400000	6000000	5701333,33	6000000,00	1769746,7490

## Wachstumstest MTT über 10 Tage am Ende der 3 Passage

Probe	0% TGF		0,1% TGF		0,01% TGF	
1	0,314	100%	0,314	100%	0,304	100%
2	0,331	105%	0,324	103%	0,312	103%
4	0,353	112%	0,328	104%	0,366	120%
5	0,404	129%	0,425	135%	0,475	156%
7	0,583	186%	0,493	157%	0,452	149%
8	0,638	203%	0,602	192%	0,596	196%
9	0,700	223%	0,637	203%	0,633	208%
10	0,720	229%	0,650	207%	0,670	220%

## 10.2 Messung der Cbfa1 Expression in Monolayerpassagen

## Deskriptive Statistik

Probe	Mittelwert	Median	Mittelw ^QT	Median ^QT	Mittelw %	Median %	Stabw	sem
d0	0,54	0,54	1,45	1,45	100%	100%	0,4700	0,3323
P1 0tgf *	1,57	1,57	2,96	2,96	203%	203%	0,0750	0,0530
P1 0,1tgf	1,08	1,08	2,11	2,11	145%	145%	0,0100	0,0071
P1 0,01tgf	0,58	0,58	1,49	1,49	103%	103%	0,1000	0,0707
P2 0tgf *	1,59	1,59	3,01	3,01	207%	207%	0,1400	0,0990
P2 0,1tgf *	1,34	1,34	2,52	2,52	174%	174%	0,1050	0,0742
P2 0,01tgf	1,06	1,06	2,08	2,08	143%	143%	0,2300	0,1626
P3 0tgf *	1,99	1,99	3,96	3,96	272%	272%	0,0650	0,0460
P3 0,1tgf *	1,53	1,53	2,89	2,89	199%	199%	0,1300	0,0919
P3 0,01tgf	1,14	1,14	2,20	2,20	151%	151%	0,4450	0,3147

## ANOVA

Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		3,742	9	,416	3,855	0,023
	Linearer Term	Kontrast	,710	1	,710	6,578	0,028
		Abweichung	3,032	8	,379	3,514	0,033
Innerhalb der Gruppen			1,079	10	,108		
Gesamt			4,820	19			

LSD						
(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
D0	P1 0tgf *	-1,03	0,33	0,01	-1,76	-0,29
	P1 0,1tgf	-0,54	0,33	0,13	-1,27	0,19
	P1 0,01tgf	-0,04	0,33	0,91	-0,77	0,69
	P2 0tgf *	-1,05	0,33	0,01	-1,78	-0,32
	P2 0,1tgf *	-0,80	0,33	0,04	-1,53	-0,06
	P2 0,01tgf	-0,52	0,33	0,14	-1,25	0,21
	P3 0tgf *	-1,45	0,33	0,00	-2,18	-0,71
	P3 0,1tgf *	-0,99	0,33	0,01	-1,72	-0,26
	P3 0,01tgf	-0,60	0,33	0,10	-1,33	0,14

## Mehrfachvergleiche LSD-Test

## 10.3 Messung der Cbfa1 Expression in Alginatkulturen

## Passage 1

## Deskriptive Statistik

Probe	Mittelwert	Median	Mittelw ^QT	Median ^QT	Mittelw %	Median %	STAB	sem
do	1,18	0,99	2,26	1,99	100%	100%	0,9382	0,355
14d 0Tgf	2,21	1,53	4,62	2,89	204%	145%	1,6462	0,672
14d 0,1Tgf	2,94	3,05	7,66	8,28	339%	417%	0,5783	0,289
14d 0,01Tgf	2,14	2,23	4,41	4,69	226%	236%	0,9800	0,490
28d 0Tgf	3,45	3,60	10,94	12,13	484%	611%	0,8397	0,317
28d 0,1Tgf	2,75	2,12	6,73	4,35	298%	219%	1,4183	0,579
28d 0,01Tgf	2,52	2,59	5,72	6,02	253%	303%	1,2771	0,521

## ANOVA

			Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		25,083	6	4,181	4,138	0,002
	Linearer Term	Ungewichtet	9,242	1	9,242	9,149	0,004
		Gewichtet	11,197	1	11,197	11,083	0,002
		Abweichung	13,886	5	2,777	2,749	0,031
Innerhalb der Gruppen			42,430	42	1,010		
Gesamt			67,513	48			

## Mehrfachvergleiche LSD-Test

	(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	d0	14d 0Tgf	-,75875	,50255	,139	-1,7729	,2554
		14d 0,1Tgf	-1,77925(*)	,57300	,003	-2,9356	-,6229
		14d 0,01Tgf	-,98458	,54282	,077	-2,0800	,1109
		28d 0Tgf	-2,29375(*)	,50255	,000	-3,3079	-1,2796
		28d 0,1Tgf	-1,37411(*)	,52019	,012	-2,4239	-,3243
		28d 0,01Tgf	-1,39554(*)	,52019	,010	-2,4453	-,3457
	14d 0Tgf	d0	,75875	,50255	,139	-,2554	1,7729
		14d 0,1Tgf	-1,02050	,57300	,082	-2,1769	,1359
		14d 0,01Tgf	-,22583	,54282	,680	-1,3213	,8696
		28d 0Tgf	-1,53500(*)	,50255	,004	-2,5492	-,5208
		28d 0,1Tgf	-,61536	,52019	,243	-1,6651	,4344
		28d 0,01Tgf	-,63679	,52019	,228	-1,6866	,4130

	14d 0,1Tgf	d0	1,77925(*)	,57300	,003	,6229	2,9356
		14d 0Tgf	1,02050	,57300	,082	-,1359	2,1769
		14d 0,01Tgf	,79467	,60862	,199	-,4336	2,0229
		28d 0Tgf	-,51450	,57300	,374	-1,6709	,6419
		28d 0,1Tgf	,40514	,58853	,495	-,7826	1,5928
		28d 0,01Tgf	,38371	,58853	,518	-,8040	1,5714
	14d 0,01Tgf	d0	,98458	,54282	,077	-,1109	2,0800
		14d 0Tgf	,22583	,54282	,680	-,8696	1,3213
		14d 0,1Tgf	-,79467	,60862	,199	-2,0229	,4336
		28d 0Tgf	-1,30917(*)	,54282	,020	-2,4046	-,2137
		28d 0,1Tgf	-,38952	,55919	,490	-1,5180	,7390
		28d 0,01Tgf	-,41095	,55919	,466	-1,5394	,7175
	28d 0Tgf	d0	2,29375(*)	,50255	,000	1,2796	3,3079
		14d 0Tgf	1,53500(*)	,50255	,004	,5208	2,5492
		14d 0,1Tgf	,51450	,57300	,374	-,6419	1,6709
		14d 0,01Tgf	1,30917(*)	,54282	,020	,2137	2,4046
		28d 0,1Tgf	,91964	,52019	,084	-,1301	1,9694
		28d 0,01Tgf	,89821	,52019	,092	-,1516	1,9480
	28d 0,1Tgf	d0	1,37411(*)	,52019	,012	,3243	2,4239
		14d 0Tgf	,61536	,52019	,243	-,4344	1,6651
		14d 0,1Tgf	-,40514	,58853	,495	-1,5928	,7826
		14d 0,01Tgf	,38952	,55919	,490	-,7390	1,5180
		28d 0Tgf	-,91964	,52019	,084	-1,9694	,1301
		28d 0,01Tgf	-,02143	,53725	,968	-1,1056	1,0628
	28d 0,01Tgf	d0	1,39554(*)	,52019	,010	,3457	2,4453
		14d 0Tgf	,63679	,52019	,228	-,4130	1,6866
		14d 0,1Tgf	-,38371	,58853	,518	-1,5714	,8040
		14d 0,01Tgf	,41095	,55919	,466	-,7175	1,5394
		28d 0Tgf	-,89821	,52019	,092	-1,9480	,1516
		28d 0,1Tgf	,02143	,53725	,968	-1,0628	1,1056

## Passage 2

### Deskriptive Statistik

Probe	Mittelwert	Median	Mittelw ^QT	Median ^QT	Mittelw %	Median %	STAB
d0	1,37	1,23	2,58	2,35	100%	100%	0,7252
do 0,1Tgf	1,07	0,93	2,10	1,91	100%	100%	0,8323
d0 0,01Tgf	1,62	1,39	3,07	2,62	100%	100%	1,3455
14d 0Tgf	2,63	2,41	6,19	5,31	239%	172%	1,5463
14d 0,1 gf	1,16	1,10	2,23	2,14	107%	113%	0,8145
14d 0,01Tgf	1,69	1,84	3,24	3,58	105%	183%	1,3318
28d 0Tgf	2,31	2,13	4,95	4,38	191%	165%	1,2593

28d 0,1Tgf	0,90	0,61	1,87	1,52	89%	81%	0,9739
28d 0,01Tgf	1,48	1,13	2,80	2,18	91%	80%	1,5682

## ANOVA

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen (Kombiniert)	12,277	8	1,535	2,682	0,013
Linearer Term	,800	1	,800	1,398	0,241
Ungewichtet					
Gewichtet	,532	1	,532	,929	0,339
Abweichung	11,746	7	1,678	2,932	0,010
Innerhalb der Gruppen	38,344	67	,572		
Gesamt	50,621	75			

## Mehrfachvergleiche LSD-Test

	(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	d0	do 0,1Tgf	,34889	,58693	,554	-,8230	1,5207
		d0 0,01Tgf	,00444	,58693	,994	-1,1674	1,1763
		14d 0Tgf	-,94556	,58693	,112	-2,1174	,2263
		14d 0,1 gf	,14792	,60499	,808	-1,0600	1,3558
		14d 0,01Tgf	-,52476	,62745	,406	-1,7775	,7280
		28d 0Tgf	-1,10444	,58693	,064	-2,2763	,0674
		28d 0,1Tgf	,27667	,58693	,639	-,8952	1,4485
		28d 0,01Tgf	,03167	,65621	,962	-1,2785	1,3418
	do 0,1Tgf	d0	-,34889	,58693	,554	-1,5207	,8230
		d0 0,01Tgf	-,34444	,58693	,559	-1,5163	,8274
		14d 0Tgf	-1,29444(*)	,58693	,031	-2,4663	-,1226
		14d 0,1 gf	-,20097	,60499	,741	-1,4089	1,0069
		14d 0,01Tgf	-,87365	,62745	,168	-2,1264	,3791
		28d 0Tgf	-1,45333(*)	,58693	,016	-2,6252	-,2815
		28d 0,1Tgf	-,07222	,58693	,902	-1,2441	1,0996
		28d 0,01Tgf	-,31722	,65621	,630	-1,6274	,9929
	d0 0,01Tgf	d0	-,00444	,58693	,994	-1,1763	1,1674
		do 0,1Tgf	,34444	,58693	,559	-,8274	1,5163
		14d 0Tgf	-,95000	,58693	,110	-2,1218	,2218
		14d 0,1 gf	,14347	,60499	,813	-1,0644	1,3514
		14d 0,01Tgf	-,52921	,62745	,402	-1,7820	,7235
		28d 0Tgf	-1,10889	,58693	,063	-2,2807	,0630
		28d 0,1Tgf	,27222	,58693	,644	-,8996	1,4441



		28d 0,01Tgf	,02722	,65621	,967	-1,2829	1,3374
	14d 0Tgf	d0	,94556	,58693	,112	-,2263	2,1174
		do 0,1Tgf	1,29444(*)	,58693	,031	,1226	2,4663
		d0 0,01Tgf	,95000	,58693	,110	-,2218	2,1218
		14d 0,1 gf	1,09347	,60499	,075	-,1144	2,3014
		14d 0,01Tgf	,42079	,62745	,505	-,8320	1,6735
		28d 0Tgf	-,15889	,58693	,787	-1,3307	1,0130
		28d 0,1Tgf	1,22222(*)	,58693	,041	,0504	2,3941
		28d 0,01Tgf	,97722	,65621	,141	-,3329	2,2874
	14d 0,1 gf	d0	-,14792	,60499	,808	-1,3558	1,0600
		do 0,1Tgf	,20097	,60499	,741	-1,0069	1,4089
		d0 0,01Tgf	-,14347	,60499	,813	-1,3514	1,0644
		14d 0Tgf	-1,09347	,60499	,075	-2,3014	,1144
		14d 0,01Tgf	-,67268	,64438	,300	-1,9592	,6139
		28d 0Tgf	-1,25236(*)	,60499	,042	-2,4603	-,0445
		28d 0,1Tgf	,12875	,60499	,832	-1,0792	1,3367
		28d 0,01Tgf	-,11625	,67241	,863	-1,4588	1,2263
	14d 0,01Tgf	d0	,52476	,62745	,406	-,7280	1,7775
		do 0,1Tgf	,87365	,62745	,168	-,3791	2,1264
		d0 0,01Tgf	,52921	,62745	,402	-,7235	1,7820
		14d 0Tgf	-,42079	,62745	,505	-1,6735	,8320
		14d 0,1 gf	,67268	,64438	,300	-,6139	1,9592
		28d 0Tgf	-,57968	,62745	,359	-1,8324	,6731
		28d 0,1Tgf	,80143	,62745	,206	-,4513	2,0542
		28d 0,01Tgf	,55643	,69269	,425	-,8266	1,9394
	28d 0Tgf	d0	1,10444	,58693	,064	-,0674	2,2763
		do 0,1Tgf	1,45333(*)	,58693	,016	,2815	2,6252
		d0 0,01Tgf	1,10889	,58693	,063	-,0630	2,2807
		14d 0Tgf	,15889	,58693	,787	-1,0130	1,3307
		14d 0,1 gf	1,25236(*)	,60499	,042	,0445	2,4603
		14d 0,01Tgf	,57968	,62745	,359	-,6731	1,8324
		28d 0,1Tgf	1,38111(*)	,58693	,022	,2093	2,5530
		28d 0,01Tgf	1,13611	,65621	,088	-,1740	2,4463
	28d 0,1Tgf	d0	-,27667	,58693	,639	-1,4485	,8952
		do 0,1Tgf	,07222	,58693	,902	-1,0996	1,2441
		d0 0,01Tgf	-,27222	,58693	,644	-1,4441	,8996
		14d 0Tgf	-1,22222(*)	,58693	,041	-2,3941	-,0504
		14d 0,1 gf	-,12875	,60499	,832	-1,3367	1,0792
		14d 0,01Tgf	-,80143	,62745	,206	-2,0542	,4513
		28d 0Tgf	-1,38111(*)	,58693	,022	-2,5530	-,2093
		28d 0,01Tgf	-,24500	,65621	,710	-1,5552	1,0652
	28d 0,01Tgf	d0	-,03167	,65621	,962	-1,3418	1,2785
		do 0,1Tgf	,31722	,65621	,630	-,9929	1,6274
		d0 0,01Tgf	-,02722	,65621	,967	-1,3374	1,2829
		14d 0Tgf	-,97722	,65621	,141	-2,2874	,3329

		14d 0,1 gf	,11625	,67241	,863	-1,2263	1,4588
		14d 0,01Tgf	-,55643	,69269	,425	-1,9394	,8266
		28d 0Tgf	-1,13611	,65621	,088	-2,4463	,1740
		28d 0,1Tgf	,24500	,65621	,710	-1,0652	1,5552

### Passage 3

#### Deskriptive Statistik

Probe	Mittelwert	Median	Mittelw ^QT	Median ^QT	Mittelw %	Median %	STAB	Sem
d0	0,67	0,94	1,60	1,91	100%	100%	0,5336	0,218
do 0,1Tgf	1,11	1,19	2,15	2,28	100%	100%	0,3239	0,132
d0 0,01Tgf	1,11	0,68	2,16	1,60	100%	100%	1,0540	0,430
14d 0Tgf	2,00	1,96	3,99	3,89	250%	203%	0,6190	0,253
14d 0,1 gf	1,75	1,40	3,35	2,64	156%	116%	1,2719	0,636
14d 0,01Tgf	2,31	2,33	4,96	5,01	229%	314%	1,2334	0,617
28d 0Tgf	1,78	1,79	3,43	3,46	215%	181%	0,2262	0,131
28d 0,1Tgf	0,93	0,85	1,91	1,80	89%	79%	0,7263	0,419
28d 0,01Tgf	1,20	0,97	2,30	1,96	106%	123%	0,5636	0,564

#### ANOVA

			Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		28,210	8	3,526	3,184	0,005
	Linearer Term	Ungewichtet	11,590	1	11,590	10,466	0,002
		Gewichtet	14,098	1	14,098	12,731	0,001
		Abweichung	14,112	7	2,016	1,821	0,103
Innerhalb der Gruppen			56,476	51	1,107		
Gesamt			84,686	59			

## Mehrfachvergleiche

LSD	(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
	d0	do 0,1Tgf	-,32750	,52616	,536	-1,3838	,7288
		d0 0,01Tgf	-,61375	,52616	,249	-1,6701	,4426
		14d 0Tgf	-1,93125(*)	,52616	,001	-2,9876	-,8749
		14d 0,1 gf	-1,41833(*)	,56832	,016	-2,5593	-,2774
		14d 0,01Tgf	-1,69833(*)	,56832	,004	-2,8393	-,5574
		28d 0Tgf	-1,65667(*)	,56832	,005	-2,7976	-,5157
		28d 0,1Tgf	-,98333	,56832	,090	-2,1243	,1576
		28d 0,01Tgf	-1,74750(*)	,64441	,009	-3,0412	-,4538
	do 0,1Tgf	d0	,32750	,52616	,536	-,7288	1,3838
		d0 0,01Tgf	-,28625	,52616	,589	-1,3426	,7701
		14d 0Tgf	-1,60375(*)	,52616	,004	-2,6601	-,5474
		14d 0,1 gf	-1,09083	,56832	,061	-2,2318	,0501
		14d 0,01Tgf	-1,37083(*)	,56832	,019	-2,5118	-,2299
		28d 0Tgf	-1,32917(*)	,56832	,023	-2,4701	-,1882
		28d 0,1Tgf	-,65583	,56832	,254	-1,7968	,4851
		28d 0,01Tgf	-1,42000(*)	,64441	,032	-2,7137	-,1263
	d0 0,01Tgf	d0	,61375	,52616	,249	-,4426	1,6701
		do 0,1Tgf	,28625	,52616	,589	-,7701	1,3426
		14d 0Tgf	-1,31750(*)	,52616	,016	-2,3738	-,2612
		14d 0,1 gf	-,80458	,56832	,163	-1,9455	,3364
		14d 0,01Tgf	-1,08458	,56832	,062	-2,2255	,0564
		28d 0Tgf	-1,04292	,56832	,072	-2,1839	,0980
		28d 0,1Tgf	-,36958	,56832	,518	-1,5105	,7714
		28d 0,01Tgf	-1,13375	,64441	,085	-2,4275	,1600
	14d 0Tgf	d0	1,93125(*)	,52616	,001	,8749	2,9876
		do 0,1Tgf	1,60375(*)	,52616	,004	,5474	2,6601
		d0 0,01Tgf	1,31750(*)	,52616	,016	,2612	2,3738
		14d 0,1 gf	,51292	,56832	,371	-,6280	1,6539
		14d 0,01Tgf	,23292	,56832	,684	-,9080	1,3739
		28d 0Tgf	,27458	,56832	,631	-,8664	1,4155
		28d 0,1Tgf	,94792	,56832	,101	-,1930	2,0889
		28d 0,01Tgf	,18375	,64441	,777	-1,1100	1,4775
	14d 0,1 gf	d0	1,41833(*)	,56832	,016	,2774	2,5593
		do 0,1Tgf	1,09083	,56832	,061	-,0501	2,2318
		d0 0,01Tgf	,80458	,56832	,163	-,3364	1,9455
		14d 0Tgf	-,51292	,56832	,371	-1,6539	,6280
		14d 0,01Tgf	-,28000	,60755	,647	-1,4997	,9397
		28d 0Tgf	-,23833	,60755	,696	-1,4580	,9814
		28d 0,1Tgf	,43500	,60755	,477	-,7847	1,6547

		28d 0,01Tgf	-,32917	,67927	,630	-1,6929	1,0345
	14d 0,01Tgf	d0	1,69833(*)	,56832	,004	,5574	2,8393
		do 0,1Tgf	1,37083(*)	,56832	,019	,2299	2,5118
		d0 0,01Tgf	1,08458	,56832	,062	-,0564	2,2255
		14d 0Tgf	-,23292	,56832	,684	-1,3739	,9080
		14d 0,1 gf	,28000	,60755	,647	-,9397	1,4997
		28d 0Tgf	,04167	,60755	,946	-1,1780	1,2614
		28d 0,1Tgf	,71500	,60755	,245	-,5047	1,9347
		28d 0,01Tgf	-,04917	,67927	,943	-1,4129	1,3145
	28d 0Tgf	d0	1,65667(*)	,56832	,005	,5157	2,7976
		do 0,1Tgf	1,32917(*)	,56832	,023	,1882	2,4701
		d0 0,01Tgf	1,04292	,56832	,072	-,0980	2,1839
		14d 0Tgf	-,27458	,56832	,631	-1,4155	,8664
		14d 0,1 gf	,23833	,60755	,696	-,9814	1,4580
		14d 0,01Tgf	-,04167	,60755	,946	-1,2614	1,1780
		28d 0,1Tgf	,67333	,60755	,273	-,5464	1,8930
		28d 0,01Tgf	-,09083	,67927	,894	-1,4545	1,2729
	28d 0,1Tgf	d0	,98333	,56832	,090	-,1576	2,1243
		do 0,1Tgf	,65583	,56832	,254	-,4851	1,7968
		d0 0,01Tgf	,36958	,56832	,518	-,7714	1,5105
		14d 0Tgf	-,94792	,56832	,101	-2,0889	,1930
		14d 0,1 gf	-,43500	,60755	,477	-1,6547	,7847
		14d 0,01Tgf	-,71500	,60755	,245	-1,9347	,5047
		28d 0Tgf	-,67333	,60755	,273	-1,8930	,5464
		28d 0,01Tgf	-,76417	,67927	,266	-2,1279	,5995
	28d 0,01Tgf	d0	1,74750(*)	,64441	,009	,4538	3,0412
		do 0,1Tgf	1,42000(*)	,64441	,032	,1263	2,7137
		d0 0,01Tgf	1,13375	,64441	,085	-,1600	2,4275
		14d 0Tgf	-,18375	,64441	,777	-1,4775	1,1100
		14d 0,1 gf	,32917	,67927	,630	-1,0345	1,6929
		14d 0,01Tgf	,04917	,67927	,943	-1,3145	1,4129
		28d 0Tgf	,09083	,67927	,894	-1,2729	1,4545
		28d 0,1Tgf	,76417	,67927	,266	-,5995	2,1279

## 11 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

München, den

Lars Walz

## 12 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Schulz für die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit im Institut für Pathologie durchführen zu können.

Mein Dank gilt vor allem :

Herrn Dr. med. Achim Battmann für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Mein Dank gilt auch:

Frau Marion Ross, der ich, nicht nur in der Anfangszeit, wesentliche Hilfe bei der Durchführung der Zellkulturen verdanke.

Den Herren PD Dr. med. Ludger Fink und Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm für die Unterstützung im Bereich der qrt-PCR.

Den Herren Dr. med. Dipl. hum. biol. Ulrich Stahl und Thomas Nusselt für die Kooperation in vielen Bereichen.

Meinen Eltern für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Auch bei meiner Freundin Jessica, meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich für das Verständnis und die Unterstützung bedanken.

## 13 LEBENS LAUF

- Lars Walz** Geboren am 22.Juli 1974 in Hanau  
Deutsche Staatsangehörigkeit
- 1980 - 1984** Stadtschule, Grundschule, Bad Vilbel
- 1984 - 1986** Förderstufe, John-F-Kennedy-Schule, Bad Vilbel
- 1986 - 1994** Gymnasium, Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel  
Abitur
- Oktober 1994 -  
März 1995** Wehrdienst, Fernmelderegiment 920, Kastellaun
- April 1995 -  
September 1995** Studium der Geologie an der Johann- Wolfgang-Goethe  
Universität, Frankfurt
- Oktober 1995 -  
März 1997** Studium der Geologie an der Technischen Universität  
Darmstadt
- Mai 1997 -  
Juli 1997** Pflegedienstpraktikum BG Unfallklinik Frankfurt/ Main
- Dezember 1997 -  
Januar 1998** Pflegedienstpraktikum und Anstellung im Pflegedienst  
BG Unfallklinik Frankfurt/ Main
- April 1998 –  
Juli 1998** Ausbildung zum Rettungssanitäter, Rettungswache  
Bergen-Enkheim e.V., Frankfurt/ Main
- Oktober 1998 -  
Oktober 2004** Studium der Humanmedizin an der Justus Liebig  
Universität Gießen
- Seit Februar 2005** Wissenschaftlicher Mitarbeiter Abteilung für Sportorthopädie  
Tech. Univ.München Klinikum Rechts der Isar, Univ. Prof. Dr.  
med. Andreas B. Imhoff

## 14 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### Vorträge

1. Battmann A, Nusselt T, Walz L, Schaller M, Hendrich C, Fink L, Haas H, Jürgensen I, Stahl U. Chondrozyten. Osteoblast 2002, Würzburg 29-30 November 2002
2. Nusselt T, Walz L, Fink L, Stahl U, Haas H, Fölsch C, Schulz A, Battmann A. Regulation der Cbfa1 Expression in gesunden und arthrotischen humanen Gelenkchondrozyten. Osteologie 2003, Göttingen 26-29 März 2003, Osteologie, Bd.12,S uppl.1: 26,
3. Walz L, Nusselt T, Fink L, Ross M, Stahl U, Bohle RM, Schulz A, Battmann A. TGF- $\beta$ 1 – verhindert die Dedifferenzierung von Chondrozyten in vitro – ein sinnvoller Cofaktor für das Tissue Engineering?. Osteologie 2004, Leipzig 3-7 März 2004, Osteologie, Bd.13,Suppl.1: 43

### Buchbeiträge

1. Battmann A, Nusselt T, Walz L, Schaller M, Hendrich C, Fink L, Haas H, Jürgensen I, Stahl U.: Chondrocytes. Chapter 13; 115-123 aus Hendrich C, Nöth U, Eulert J. Cartilage Surgery and Future Perspectives. Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

### Poster

1. Nusselt T, Walz L, Fink L, Bohle RM, Schulz A, Stahl U, Battmann A. Regulation der Cbfa1 expression in humanen Gelenkchondrozyten in vivo. 2. Bad Sassendorfer Knorpelsymposium 6-7.9.2002, 1.Posterpreis
2. Walz L, Nusselt T, Fink L, Stahl U, Wilhelm J, Bohle RM, Schulz A, Battmann A. TGF $\beta$ 1 prevents dedifferentiation of alginate embedded chondrocytes in vitro. Strategies in Tissue Engineering. 15-19 Juni 2004 Würzburg. Cytotherapy 2004 Vol 6 (3):299