



*Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Biomedizin (Biomedicine)*

**Tissue Engineering eines Meniskus - Vom Biomaterial
zum Implantat**
**Tissue Engineering of a meniscus - from a biomaterial
to the implant**

Vorgelegt von
Jenny Weyhmüller Reboredo
aus
Heilbronn

durchgeführt am
Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
Universitätsklinikum Würzburg
Würzburg, 2014

Eingereicht am: 04. April 2014

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Heike Walles

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Dandekar

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hirth

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 04.04.2014

Jenny Weyhmüller Reboredo

1. Teilaspekte dieser Arbeit wurden in folgenden vorrezensierten Journalen veröffentlicht:

Kahlig A, Hansmann J, Groeber F, Schwarz T, **Weyhmüller J**, Illig A, Kleinhans C, Walles H: In silico Approaches for the Identification of Optimal Culture Condition for Tissue Engineered Bone Substitutes. *Current Analytical Chemistry*, 2013; 9(1):16-28

Moll C*, **Reboredo J***, Schwarz T, Appelt A, Schürlein S, Walles H, Nietzer S: Tissue Engineering of a human 3D in vitro tumor test system. *Journal of Visualized Experiments*, 2013; 78:e50460

* These authors contributed equally

Reboredo J, Murawicki S, Rackwitz L, Steinert A, Nöth U, Rudert M, Walles H: Five-layered Collagenous Scaffold Induce Chondrogenic Differentiation of Human MSC. *in preparation*

2. Teilaspekte dieser Doktorarbeit wurden bereits auf folgenden Kongressen präsentiert:

Bayern Innovativ - Forum Life Sciences (München, 23.-24.03.2011)

Poster: "Establishment of an in vitro model with human mesenchymal stem cells and microvascular endothelial cells for meniscal repair"

Weyhmüller J, Rücker C, Steinert A, Rudert M, Walles H, Heymer A

TERMIS-EU 2011 Annual Meeting (Granada, 07.-10.06.2011)

Poster: "Establishment of an in vitro Model with human Mesenchymal Stem Cells and microvascular Endothelial Cells onto an Electrospun Collagen Type I/II Scaffold for Meniscal Repair"

Weyhmüller J, Rücker C, Steinert A, Rackwitz L, Rudert M, Walles H, Heymer A

DKOU 2011 (Berlin, 25.-28.10.2011)

Poster: "Besiedelung und Ko-Kultivierung verschiedener Kollagen Matrices mit humanen mesenchymalen Stammzellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen"

Weyhmüller J, Mugele D, Unger C, Heymer A, Rudert M, Walles H, Steinert A

Dieser Beitrag wurde von dem Organisationskomitee der DGOU mit einem Posterpreis in der Kategorie "Experimentell - Tissue Engineering" ausgezeichnet.

III. Interdisziplinärer Kongress Junge Naturwissenschaft und Praxis (Berlin, 18.-19.10.2011)

Poster: "Chancen des interdisziplinären Arbeitsfeldes Tissue Engineering"

Weyhmüller J, Hansmann J, Marx U, Traube A, Walles H

World Conference on Regenerative Medicine (WCRM) (Leipzig, 02.-04.11.2011)

Poster: "Spontaneous chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells onto an electrospun collagen type I/II scaffold"

Weyhmüller J, Rücker C, Steinert A, Rackwitz L, Rudert M, Heymer A, Walles H

1st Scientific Seminar of NBBA (Erlangen, 17.01.2012)

Vortrag: "Engineering of meniscus replacement tissue"

Weyhmüller, J

4th International Symposium Interface Biology of Implants (IBI) (Rostock, 09.-11.05.2012)

Poster: "Collagen Type I and II Electrospun Scaffolds for Meniscal Cartilage Repair"

Weyhmüller J, Rackwitz L, Steinert A, Rudert M, Walles H

IZKF Projektleiterseminar (Kloster Banz, 04.-05.05.2012)

Poster: "Scaffold Evaluation and Co-Culture of hMSCs and hmvECs as preliminary work to generate a Vascularised Meniscus 3D Model"

Weyhmüller J, Rücker C, Rudert M, Steinert A, Walles H

3rd International Conference "Strategies in Tissue Engineering" (Würzburg, 23.-25.05.2012)

Poster: "Interaction of human Mesenchymal Stem Cells and human Meniscus Cells with extracellular matrix and neighboring cells"

Weyhmüller J, Rücker C, Mugele D, Unger C, Murawicki S, Rackwitz L, Rudert M, Steinert A, Walles H

TERMIS-EU 2012 Annual Meeting (Wien, 05.-08.09.2012)

Poster: "Interaction of human Mesenchymal Stem Cells and human Meniscus Cells with extracellular matrix and neighboring cells"

Reboredo J, Mugele D, Unger C, Murawicki S, Rackwitz L, Rudert M, Steinert A, Walles H

IZKF Externe Begutachtung (Würzburg, 09.-10.10.2012)

Poster: "Tissue Engineering von vaskularisiertem Meniskusgewebe mit einer neuartigen Bio-

matrix"

Reboredo J, Steinert A, Rudert M, Walles H

DGBM 2012 Jahrestagung (Hamburg, 01.-03.11.2012)

Poster: "Differentiation of human MSCs towards the chondrogenic lineage by using a Collagen Type I and II Electrospun Scaffold"

Reboredo J, Rucker C, Rackwitz L, Steinert A, Rudert M, Walles H

IZKF Projektleiterseminar (Kloster Banz, 07.-08.06.2013)

Vortrag: "Tissue Engineering von vaskularisiertem Meniskusgewebe"

Reboredo J, Rucker C, Rudert M, Steinert A, Walles H

9. Thüringer Biomaterial-Kolloquium (Zeulenroda, 05.09.2013)

Vortrag: "Neues Biomaterial für die Geweberegeneration: Trägerstruktur aus Kollagen I/II regt Stammzellen zur chondrogenen Differenzierung an"

Reboredo J, Murawicki S, Steinert A, Rackwitz L, Nöth U, Rudert M, Walles H

World Conference on Regenerative Medicine (WCRM) (Leipzig, 23.-25.10.2013)

Poster: "By Co-Culturing Human Meniscal Cells In A Vascularized Scaffold Under Dynamic Culture Conditions Endostatin Production Is Reduced"

Rucker C, **Reboredo J**, Mugele D, Steinert A, Rudert M, Walles H

3. Ein Beitrag zu dieser Arbeit wurde im Bayerischen Rundfunk TV in der Sendungsreihe Faszination Wissen "Künstliche Organe - Erste Erfolge der Gewebezüchter" am 05.07.2013 ausgestrahlt.

4. Ein Artikel zu dieser Arbeit wurde im Magazin Focus Gesundheit: Knochen & Gelenke "Revolution in der Pufferzone", Ausgabe Dezember/Januar 2013/14 veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	XIII
Abkürzungen	XIII
Formelzeichen	XVI
1 Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2 Einleitung	5
2.1 Medizinische Problematik	5
2.2 Therapieansätze von Meniskusschäden	6
2.3 Limitationen etablierter Therapien	7
2.4 Kenngrößen für einen optimalen Meniskusersatz	9
2.4.1 Blutgefäßversorgung der Kniegelenkmenisken	9
2.4.2 Struktur und Kollagenfasertextur	10
2.4.3 Biomechanische Eigenschaften des Meniskus	11
2.5 Tissue Engineering für suffizienten Meniskusersatz	12
2.5.1 Prinzip Tissue Engineering	13
2.5.2 Aufbau von Implantaten	14
2.5.3 Entwicklung von 3D Testsystemen	18
2.6 Das Elektrospinning als ein biotechnologisches Herstellungsverfahren von 3D Trägermaterialien	19
2.7 Stammzelltherapie und Differenzierungspotential von Stammzellen	20
2.8 Angiogenese und die Rolle der mikrovaskulären Endothelzellen	23
2.9 Anwendung von Bioreaktorsystemen im Tissue Engineering	25
2.9.1 Bioreaktoren allgemein	25
2.9.2 Bioreaktoren für das Knorpel-Tissue Engineering	26
2.10 Ziel der Arbeit	28
3 Material	30

3.1	Biologisches Material	30
3.1.1	Zellkultur	30
3.1.2	Kollagenbasierte Biomaterialien	32
3.2	Materialien für die Genexpressionsanalyse	33
3.3	Antikörper, Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie	34
3.4	Medien für Zellkultur, Puffer und Lösungen	36
3.5	Chemikalien	38
3.6	Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien	41
4	Methoden	46
4.1	Steriler Arbeitsplatz	46
4.2	Zellisolation und Kultivierung der Zellen	47
4.2.1	Isolation humaner mesenchymaler Vorläuferzellen aus Spongiosa	47
4.2.2	Isolation porciner mesenchymaler Vorläuferzellen aus Knochenmarksa- spirat	49
4.2.3	Isolation von primären mikrovaskulären Endothelzellen aus der Haut	50
4.2.4	Isolation primärer Meniskuszellen	53
4.2.5	Passagieren von Zellen	55
4.2.6	Zählung und Vitalitätsbestimmung	57
4.2.7	Markierung der Zellen mit Dil	58
4.3	Differenzierung humaner und porciner Vorläuferzellen	60
4.4	Kollagenisolation	63
4.4.1	Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen	63
4.4.2	Kollagen Typ II aus Kälberknorpel	65
4.5	Herstellung von 3D Biomaterialien auf Kollagenbasis	67
4.5.1	Kollagen Typ I Hydrogel	67
4.5.2	Elektrospinning Matrices	67
4.5.3	Crosslinken von elektrogenesponnenen Kollagen-Scaffolds	69
4.5.4	Dezellularisierung einer Biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc®)	70
4.6	Besiedelung von Matrices mit Zellen	74
4.6.1	Aufbau von 2D Ko-Kulturmodellen	75
4.6.2	Zellbesiedelung biologischer 3D Biomaterialien	76
4.6.3	Rebesiedelung der BioVaSc® mit Endothelzellen	77
4.6.4	Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts	80
4.7	Rasterelektronenmikroskopie	81
4.8	Zelltoxizitätstestung	82
4.8.1	Zellviabilitätstest MTT	82

4.8.2	Lebend-Tot-Färbung	83
4.9	Histologie und Immunhistologie	84
4.9.1	Zellfixierung	84
4.9.2	Paraffineinbettung	85
4.9.3	Zellen auf Cytospots	87
4.9.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung	88
4.9.5	Ölrot Färbung	91
4.9.6	Alizarin Rot S-Färbung	92
4.9.7	Alcianblau Färbung	93
4.9.8	Movat-Pentachrom Färbung	95
4.9.9	Immunhistologische Färbung	98
4.10	Molekularbiologie	101
4.10.1	Isolation von RNA	101
4.10.2	cDNA-Synthese	105
4.10.3	Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)	106
4.10.4	Agarose-Gelelektrophorese	107
4.11	Papain-Verdau	108
4.12	DNA Gehaltsbestimmung	110
4.13	GAG Gehaltsbestimmung	112
4.14	Konstruktion eines gewebespezifischen Bioreaktors	114
5	Ergebnisse	119
5.1	Charakterisierung von nativem Meniskusgewebe	119
5.2	Aufbau von Ko-Kultursystemen mit Primärzellen	124
5.2.1	Charakterisierung der verwendeten Zelltypen	124
5.2.2	Synthetisches 2D Ko-Kulturmodell auf einer PET Membran	126
5.2.3	Natürliches 2D Ko-Kulturmodell auf einem kollagenbasierten Zellträger	127
5.3	Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts	129
5.3.1	3D Biomaterialauswahl für humane Meniskuszellen	129
5.3.2	3D Ko-Kulturmodell: Rebesiedelung der BioVaSc [®]	130
5.3.3	Vergleich der Ko-Kultur Meniskuskonstrukte mit statisch kultivierten Mono-Kulturen	132
5.3.4	Neovaskularisation des 3D Meniskuskonstrukts	133
5.3.5	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	134
5.4	Etablierung einer Trägermatrix zur Anregung der Stammzellendifferenzierung . .	139
5.4.1	Charakterisierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	139
5.4.2	Biomaterialauswahl für humane Stammzellen	142

5.4.3	Faserstruktur und Aufbau der elektrogenesponnenen Kollagen Typ I/II Matrix	143
5.4.4	Untersuchung zur Festlegung der geeigneten Vernetzungszeit für die elektrogenesponnene Kollagen Typ I/II Matrix	145
5.4.5	Untersuchung der Zellmigration auf der Kollagen Typ I/II Trägermatrix	147
5.4.6	Untersuchungen zur Zellvitalität	148
5.4.7	Untersuchungen zur Zelldifferenzierung	149
5.4.8	Bestimmung des Proteoglykangehalts	156
5.5	Technische Entwicklung eines gewebespezifischen Bioreaktors	158
6	Diskussion und Ausblick	160
6.1	Knorpelregeneration und Limitationen	160
6.2	Aufbau von Ko-Kultursystemen mit Primärzellen	163
6.3	Entwicklung geeigneter 3D Trägerstrukturen	169
6.4	Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts	176
6.5	Bioreaktorentwicklung und ihre Anwendung im Tissue Engineering	180
6.6	Implantate	183
6.7	Ausblick	184
	Literaturverzeichnis	187
	Abbildungsverzeichnis	213
	Tabellenverzeichnis	214
	Lebenslauf	215
	Mein herzlicher Dank geht an...	217

Symbolverzeichnis

Abkürzungen

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Österreich
ADSZ	Adipöse mesenchymale Stammzellen (Adipose-Derived Stem Cells)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbeitsunfähigkeit
AZ	Azellularisierung
B	Breite
BioVaSc [®]	Biological Vascularized Scaffold
BKK	Betriebskrankenkasse
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (Bone Morphogenetic Protein)
bp	Basenpaar (base pair)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CH	Schweiz
CMI	Kollagen Meniskusimplantat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (day)
D	Deutschland
d. h.	das heißt
DAK	Deutsche Angestellten-Krankenkasse
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dil	Dialkylcarbocyanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSred	Rot fluoreszierendes Protein (aus Discosoma)
EO	Ethylenoxid
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells)
ES	Elektrospinning
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
EthDh	Ethidium Homodimer-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor)
FMZ	Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GMP	Good Manufacturing Practice
GNL	Gelneutralisationslösung
h	Stunde
H	Höhe
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Hepatocyte Growth Factor)
HMDI	Hexamethylen-diisocyanat
hmvEZ	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
hMSZ	humane mesenchymale Stammzellen
hMZ	humane Meniskuszellen
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ID	Innendurchmesser
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like Growth Factor)
IRL	Irland
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KCl	Kaliumchlorid

KGM	Keratinocyte Growth Medium
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Kol	Kollagen
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
N/A	nicht vorhanden (not available)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NL	Holland
P	Passage
PBS ⁻	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne divalenten Kationen (Phosphate Buffered Saline)
PBS ⁺	Phosphatgepufferte Salzlösung mit divalenten Kationen
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platten Wachstumsfaktor (Platelet Derived Growth Factor)
PEEK	Polyetheretherketon
PGA	Polyglycolsäure
PLGA	Poly lactid-co-Glycolid
PLLA	Poly-L-Lactat
pmvEZ	porcine mikrovaskuläre Endothelzellen
pMSZ	porcine mesenchymale Stammzellen
pMZ	porcine Meniskuszellen
PUR	Polyurethan
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SIS	Dünndarmsubmucosa
SIS-muc	Dünndarmsubmucosa der BioVaSc [®]
SOP	Standardisierte Arbeitsanweisung (Standard Operating Procedure)
Std	Standard
Stk	Stück

rpm	Umdrehung pro Minute (revolutions per minute)
T	Tiefe
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	Endothel Wachstumsfaktor (Vascularized Endothelial Growth Factor)
z. B.	zum Beispiel
ZKRD	Zentrales Knochenmarkspender Register Deutschland

Formelzeichen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
$E - Modul$	MPa	Elastizitätsmodul
f	1/s	Frequenz
$mmHg$	mmHg	Druck
MW_{avital}	1	Mittelwert der avitalen Zellen
MW_{vital}	1	Mittelwert der vitalen Zellen
$V_{Susp.ges.}$	ml	Gesamtvolumen der Probensuspension
V_Z	%	Zellvitalität
VF_{TB}	1	Verdünnungsfaktor Trypanblau
ZZ_{gesamt}	1	Gesamtzellzahl
ZZ_{vital}	1	Lebendzellzahl

Kapitel 1

Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Der Meniskus, ein scheibenförmiger Faserknorpel, spielt im Kniegelenk eine bedeutende Rolle, weil er Kräfte und Druck im Kniegelenk gleichmäßig verteilt, Stöße dämpft sowie der Kraftübertragung und Stabilisierung dient. Durch die Entfernung des Gewebes, der sogenannten Totalmeniskektomie, nach einer Meniskusverletzung oder einem Riss, verändern sich die mechanischen Eigenschaften des Gelenks stark und verursachen durch die erhöhte Belastung der Gelenkflächen Arthrose (Krause et al., 1976). Arthrose ist weltweit die häufigste aller Gelenkerkrankungen. Der Erhalt der körperlichen Leistungsfähigkeit und Mobilität bis ins hohe Alter sowie die Bewahrung der Gesundheit von Herz-Kreislauf- und Stoffwechselorganen zählen aufgrund des demografischen Wandels zu den großen medizinischen Herausforderungen. Die Erkrankung des muskuloskelettalen Systems stellte 2010 im Bundesgebiet die am häufigsten vorkommende Krankheitsart dar.

Während Risse in den äußeren Teilen des Meniskus aufgrund des Anschlusses an das Blutgefäßsystem spontan heilen können, können sie dies in tieferen Zonen nicht (Sweigart and Athanasiou, 2001). Durch die begrenzte Heilungsfähigkeit des Knorpels bleibt langfristig der Einsatz eines Ersatzgewebes die einzige therapeutische Alternative.

In der vorliegenden Arbeit wurde als therapeutische Alternative erfolgreich ein vaskularisiertes Meniskusersatzgewebe mit Methoden des Tissue Engineering entwickelt. Es soll in Zukunft als Implantat Verwendung finden. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld, in dem Gewebe außerhalb des Körpers generiert werden. Schlüsselkomponenten sind Zellen, die aus einem Organismus isoliert werden, und Trägerstrukturen, die mit Zellen besiedelt werden. Die Biomaterialien geben den Zellen eine geeignete Umgebung, die die Extrazelluläre Matrix (EZM) ersetzen soll, um die Funktion der Zellen beizubehalten, eigene Matrix zu bilden. Zum

Erhalt eines funktionelles Gewebes werden oftmals dynamische Kultursysteme, sogenannte Bioreaktoren, verwendet, die natürliche Stimuli wie beispielsweise den Blutfluss oder mechanische Kompressionskräfte während der *in vitro* Reifungsphase des Gewebes, zur Verfügung stellen. Das Gewebekonstrukt wurde auf Basis natürlicher Biomaterialien aufgebaut, unter Verwendung ausschließlich primärer Zellen, die später direkt vom Patienten gewonnen werden können und damit Abstoßungsreaktionen auszuschließen sind. Da der Meniskus teilvaskularisiert ist und die *in vivo* Situation des Gewebes bestmöglich nachgebaut werden sollte, wurden Konstrukte mit mehreren Zelltypen, sogenannte Ko-Kulturen aufgebaut. Neben mikrovaskulären Endothelzellen (mvEZ) und Meniskuszellen (MZ) erfolgten Versuche mit mesenchymalen Stammzellen (MSZ).

Zur Bereitstellung einer zelltypspezifischen Matrixumgebung, diente den mvEZ ein Stück Schweinedarm mit azellularisierten Gefäßstrukturen (BioVaSc[®]) und den MZ diente eine geeignete Kollagenmatrix (Kollagen Typ I Hydrogel). Die Validierung und Charakterisierung des aufgebauten 3D Meniskuskonstrukts, welches in einem dynamischen Perfusions-Bioreaktorsystem kultiviert wurde, erfolgte mit knorpeltypischen Matrixmarkern wie Aggrekan, Kollagen Typ I, II und X sowie mit den Transkriptionsfaktoren RunX2 und Sox9, die in der Knorpelentstehung von großer Bedeutung sind. Zusätzlich erfolgten Auswertungen mit endothelzellspezifischen Markern wie vWF, CD31 und VEGF, um die Vaskularisierung im Konstrukt nachzuweisen. Analysiert wurden auch die Zellvitalitäten in den Konstrukten.

Aufgrund einer nur geringen Verfügbarkeit von MZ wurden Kulturansätze mit alternativen Zellquellen, den MSZ, durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst deren Isolation und Charakterisierung und die Auswahl einer geeigneten 3D Kollagenmatrix. Die beste Zellintegration der MSZ konnte auf einer eigens hergestellten elektrogewebenen Matrix beobachtet werden. Die Matrix besteht aus zwei unterschiedlichen Kollagentypen, die auf insgesamt fünf Schichten verteilt sind. Die Fasern besitzen weiter unterschiedliche Ausrichtungen. Während die Kollagen Typ I Fasern in den äußeren Schichten keiner Ausrichtung zugehören, liegen die Kollagen Typ II Fasern in der mittleren Schicht parallel zueinander. Der native Meniskus war für den Aufbau einer solchen Kollagen-Trägerstruktur das natürliche Vorbild, das imitiert werden sollte. Nach der Besiedelung der Matrix mit MSZ, konnte eine Integration der Zellen bereits nach vier Tagen bis in die Mittelschicht sowie eine spontane chondrogene Differenzierung nach einer insgesamt dreiwöchigen Kultivierung gezeigt werden. Das Biomaterial stellt in Hinblick auf die Differenzierung der Zellen ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren eine relevante Bedeutung für klinische Studien dar.

Zur Kultivierung des 3D Meniskuskonstrukts wurde ein Bioreaktor entwickelt. Mit diesem können neben Perfusion der Gefäßsysteme zusätzlich Kompressionskräfte sowie Scherspannungen auf das Ersatzgewebe appliziert und die Differenzierung von MZ bzw. MSZ während der *in vitro* Kultur über mechanische Reize stimuliert werden. Ein anderes Anwendungsfeld für den

neuartigen Bioreaktor ist seine Verwendung als Prüftestsystem für die Optimierung und Qualitätssicherung von Gewebekonstrukten.

1.2 Abstract

The meniscus, a disk-shaped fibrous cartilage, plays an important role in the equal distribution of pressure, shock absorption, power transmission and stability within the knee joint. After a meniscus injury or a meniscus tear, a total meniscectomy is done where the complete tissue is removed. This leads to a change of mechanical properties in the joint and causes arthrosis by an increased strain on the joint surfaces (Krause et al., 1976). Worldwide arthrosis is the most frequent of all joint diseases. Due to the demographic change, maintaining physical fitness and mobility up to an old age are the main challenges besides ensuring health of the heart and circulatory system and of the metabolic organs. Musculoskeletal disorders represented the most frequent type of disease in Germany in 2010.

While tears in the outer zone of the meniscus heal spontaneously because of its connection to the blood vessel system, tears in the deeper zones do not heal (Sweigart and Athanasiou, 2001). Due to the limited healing capacity of cartilage the use of a replacement tissue is the only therapeutic alternative in the long run.

In the present work a vascularized meniscus construct as therapeutic alternatives has been developed with the Tissue Engineering method for the further use as an implant. Tissue Engineering is an interdisciplinary research field to generate tissues outside the body. The key components are isolated cells from an organism, and scaffolds, which are seeded with cells. Biomaterials provide a suitable environment that replaces the extracellular matrix (ECM) to maintain cell functionality to let cells build up their own matrix. To maintain a functional tissue during *in vitro* dynamic culture, bioreactor systems are used to provide natural stimuli such as blood flow or mechanical compression forces.

The tissue construct is based on natural biomaterials and solely on primary cells, which later can be isolated directly from the patient and thereby exclude repulsion reactions. Due to its limited vascularity of the meniscus and the aim to build up at its best the *in vivo* situation more than one cell type is used to generate constructs, so called co-culture systems. Mesenchymal stem cells (MSZ) besides microvascular endothelial cells (mvEZ) and meniscus cells (MZ) were used in the experiments.

To supply a cell type specific matrix environment, a segment of a porcine jejunum with decellularized vascular structures (BioVaSc[®]) for the mvEZ and a collagen based matrix (collagen

type I hydrogel) for the MZ were employed. The validation and characterization of the developed 3D meniscus construct, that was cultured in a dynamic perfusion bioreactor system, was performed by using cartilage matrix specific markers, such as aggrecan, collagen type I, II and X, as well as the transcription factors RunX2 and Sox9 that are of major importance for cartilage development. Further analysis with endothelial cell specific markers, such as vWF, CD31 and VEGF were performed to evaluate the vascularization of the construct. Furthermore, cell vitality tests of the construct were made.

Because of the limited availability of primary MZ, culture approaches with MSZ as an alternative cell source were investigated. Cell isolation and characterization were performed and a suitable 3D collagen matrix was selected. The best cell integration of the MSZ could be observed on a specifically engineered electrospun matrix. The matrix consists of two different collagen types that are arranged in a total of five layers. The fibers are further orientated in different directions. While outer layers consist of randomly-aligned collagen type I fibers, the collagen type II fibers in the middle layer are aligned parallel to each other. The native meniscus tissue serves as natural example and its structure is replicated in such a collagen scaffold. After seeding the scaffold with MSZ, cell integration into the middle layer could be observed after four days, as well as a spontaneous chondrogenic differentiation after three weeks of culture. The biomaterial developed in this work has to be considered as relevant for clinical studies with regard to cell differentiation without adding growth factors to the culture.

For the culture of 3D meniscus construct a bioreactor was successfully developed, that can apply compressive strength and shear stress to the tissue model in addition to perfusing the vascular system. With these measures the differentiation of MZ or MSZ could be induced with mechanical strains during the *in vitro* culture. Another field of application for the new bioreactor is its use as a test system for the optimization and quality control of the tissue models.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Medizinische Problematik

Aufgrund des demografischen Wandels und eines steigenden Bedürfnisses nach Aktivität und Mobilität in der Bevölkerung, ist die Ausrichtung der muskuloskelettalen Forschung von entscheidender Bedeutung, um suffiziente Behandlungsmöglichkeiten in der Zukunft vorhalten zu können. In diesem Kontext ist eine Stärkung des Bewusstseins für eine umfassende Forschungslandschaft in Deutschland und die Notwendigkeit intensiver Forschungsförderung essentiell.

Der muskuloskelettalen Forschung stehen heute enorme Herausforderungen gegenüber, welche in der steigenden Häufigkeit muskuloskelettaler Erkrankungen in einer alternden Bevölkerung sowie begrenzter therapeutischer Möglichkeiten begründet sind. Neben der Bewahrung der kognitiven Fähigkeiten, sowie der Gesundheit von Herz-Kreislauf- und Stoffwechselorganen, zählt der Erhalt der körperlichen Leistungsfähigkeit und Mobilität bis ins hohe Alter zu den großen medizinischen Herausforderungen. Erkrankungen und Verletzungen der Haltungs- und Bewegungsorgane haben weltweit eine hohe gesundheitspolitische und gesellschaftliche Bedeutung. Sie gehören zu den häufigsten und kostenträchtigsten Leiden in Deutschland und steigen mit zunehmendem Alter kontinuierlich an: von 9,1 % bei den 15- bis 19-Jährigen bis auf 29,1 % bei den über 60-Jährigen (Bundesministerium, 2006). Ursächlich hierfür sind insbesondere langwierige chronisch degenerative Erkrankungen im Alter (DAK-Forschung, 2012). Im Jahr 2011 verursachten diese einen Anteil von 21,3 % am Krankenstand. Mit 281,5 Tagen Arbeitsunfähigkeit je 100 Versicherte lagen muskuloskelettale Erkrankungen, wie bereits in den Vorjahren, verglichen am Tagesvolumen an der Spitze (DAK-Forschung, 2012).

Für den in den letzten vier Berichtsjahren registrierten Anstieg der Fehlzeiten wird neben demografischen Auswirkungen infolge alternder Belegschaften vor allem der Wandel in der Arbeitswelt verantwortlich gemacht. So hat sich beispielsweise das Spektrum der Arbeits-

unfähigkeit (AU)-Diagnosen mehr und mehr von Herz- und Kreislauferkrankungen vor allem auf muskuloskelettale Erkrankungen und psychische Belastungsstörungen verschoben. Die herkömmliche Erwartung, dass die Krankenstände in Zeiten wirtschaftlicher Unsicherheit sinken, trifft in dieser Form nicht mehr zu (Bundesverband, 2011). Zu den häufigsten Krankheitsarten im Bundesgebiet 2010 sind drei Erkrankungsgruppen dominierend, wobei die Erkrankung des Muskel-/Skelettsystems mit 26,6 % die am häufigsten Vorkommende darstellt.

Knorpelschäden zum Beispiel sind eine der Hauptursachen für chronische Schmerzen, eingeschränkte Beweglichkeit und einem Verlust an Lebensqualität. Arthrose ist die Häufigste aller Gelenkerkrankungen. Weltweit sollen mehr als 151 Millionen Menschen davon betroffen sein; in Deutschland leiden mehr als 5 Millionen Menschen daran (Orthoworld, 2010). Am Anfang der Erkrankung steht häufig nur ein kleiner Defekt, der weiter wächst, weil der Körper nicht in der Lage ist, Knorpelgewebe selbstständig zu regenerieren.

Auch die Heilungsfähigkeit des Meniskus, ein scheibenförmiger Faserknorpel im Kniegelenk ist begrenzt. Ursache für Meniskusrisse können Sportverletzungen sein, oder ein normaler Altersverschleiß führt zur Degeneration des Meniskus. Ist das Knorpelgewebe großflächig zerstört, ist ein operativer Eingriff in der Regel unumgänglich und die Patienten kommen um eine Meniskusresektion nicht herum. Langfristig bleibt der Einsatz eines künstlichen Gelenks die einzige therapeutische Alternative.

2.2 Therapieansätze von Meniskusschäden

Während Risse in den äußeren Teilen des Meniskus aufgrund des Anschlusses an das Blutgefäßsystem spontan heilen können, geschieht dies in tieferen Zonen nicht (Sweigart and Athanasios, 2001). Da den Menisken nur eine geringe Funktion als Überbleibsel von Beinmuskulatur zugeschrieben wurde, war die Totalmeniskektomie eine ursprüngliche Behandlungsmethode (Cooper et al., 1990). Es wurde allerdings beschrieben, dass die mechanischen Eigenschaften des Gelenks sich durch das Entfernen des Meniskus stark verändern und weiter durch erhöhte Belastung der Gelenkflächen Arthrose verursacht wird (Krause et al., 1976). Lee et al. konnten zeigen, dass die Kontaktdrücke auf die Knorpelflächen mit zunehmender Resektion des medialen Meniskus steigen und diese bei einer Totalmeniskektomie im Vergleich zu einem gesunden Meniskus beinahe auf das bis zu 2,4-fache anwachsen (Lee et al., 2006).

Mit der Entwicklung der Arthroskopie ergab sich die Möglichkeit, Risse im Meniskus zu nähen, was vor allem die Heilung von Verletzungen in den äußeren, vaskularisierten Zonen des Gewebes unterstützt (Pasa, 2005). Prädestiniert für diese Art der Therapie sind junge Pati-

enten mit Längsrissen. Die Versorgung vollständiger Radiärrisse erscheint problematisch, da die Naht eines Radiärrisses durch zirkuläre Ringspannungen stark beansprucht wird (Achtlich et al., 2011).

Die Abrasionstherapie ist eine weitere Methode, die genutzt wird, um den Heilungsprozess zu fördern. Hierbei wird das umliegende Gewebe um den Riss aufgeraut und nekrotisches Gewebe entfernt (McAndrews and Arnoczky, 1996).

Neben den verschiedenen Nahttechniken können zur Heilung von Rissen in der vaskularisierten Zone die Methoden einer Meniskusrefixation mit Pfeilen und Ankern, der Nahtabdichtung mit Fibrin sowie das Laserschweißen verwendet werden. Sobald der Riss in der avaskulären Zone auftritt, ist eine Heilungsmethode mit induzierter Vaskularisation notwendig. Dazu zählt die Methode der vaskulären Zugangskanäle oder Trepanationen (Zhang et al., 1995; McAndrews and Arnoczky, 1996; Zhang et al., 1988). Durch das Anlegen großer Zugangskanäle, die von der Peripherie des Meniskus bis zum Defekt reichen, wurde versucht, eine bessere Heilung im avaskulären Bereich des Meniskus zu erreichen. Es zeigte sich jedoch, dass die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Narbengewebes wesentlich schlechter sind, als die des ursprünglichen Meniskusgewebes (Spank, 2004). Ebenso kommt es bei dieser Technik zu einer Zerstörung der Kollagenstruktur (McAndrews and Arnoczky, 1996). Eine weitere Methode Vaskularisation zu induzieren, ist das Einnähen einer Synovialmembran in den Riss, was zumindest im Tierversuch zu Vaskularisation zuvor gefäßfreier Bereiche und dem Einwachsen fibrösen Gewebes führte (Cisa et al., 1995).

Die Möglichkeiten, einen stark geschädigten Meniskus nach kompletter Entfernung zu ersetzen, reichen von der Konstruktion künstlicher Menisken aus synthetischen bis biologischen Materialien. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines transplantierten Meniskusgewebes, das nicht vom Empfänger selbst, sondern von einem genetisch nicht-identischen Spender derselben Art stammt, sogenannte Allografts.

2.3 Limitationen etablierter Therapien

Eine Option, größere Meniskusdefekte weitgehend suffizient und langfristig erfolgreich zu ersetzen, ist der Kollagenmeniskus CMI Menaflex[®] von ReGen Biologics, New Jersey USA. Das von Stone et al. entwickelte Meniskusimplantat besteht aus bovinem Achillessehngewebe, ein Scaffold aus gereinigten Kollagen Typ I Fasern, aufgeschwemmt mit Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat, homogenisiert und zusätzlich mit Glykosaminoglykanen angereichert (Rodkey et al., 1999; Stone et al., 1990). Bereits 1992 wurde in den ersten Tierexperimenten

festgestellt, dass das Implantat nicht toxisch ist, die Formation einer Kollagenmatrix unterstützt und Zellen in das Netzwerk einwachsen. Mit dem CMI Menaflex[®] kann in vielen Fällen eine relevante Defektfüllung nachgewiesen werden (Kohn et al., 2011). Allerdings ist das Implantat nicht vaskularisiert.

Seit 2008 ist neben dem Menaflex[®] ein Polyurethanmeniskus, Actifit[®] der Firma Ormed-DJO aus Freiburg in der klinischen Anwendung. Actifit[®] ist ein synthetisches Meniskusimplantat, das zu 80 % aus dem biologisch abbaubaren Polyester Poly(ϵ -caprolactone) und 20 % aus Polyurethan (PUR) besteht. Maher et al. veröffentlichte Ergebnisse zu Testungen des Actifit[®] am Schafmodell. Hierbei zeigte sich ein gutes Einwachsverhalten von fibrocartilaginärem Gewebe. Nach Implantation eines Polyurethanmeniskuscaffolds am Hundemodell beobachtete Welsing et al. zwar ein Einwachsen von knorpelähnlichem Gewebe, eine Umwandlung in meniskusähnliches Gewebe sowie ein Abbau des Scaffolds konnte jedoch nicht belegt werden (Maher et al., 2010; Welsing et al., 2008; Kohn et al., 2011).

Weitere künstliche Konstrukte, die beispielsweise aus Dacron oder Teflon hergestellt wurden, liefern sowohl mit als auch ohne Polyurethanbeschichtung unbefriedigende Ergebnisse durch übermäßigen Materialabrieb und daraus folgenden schweren Gelenkreaktionen (Messner, 1994a,c; Kohn et al., 2011).

Das Meniskusallgraft ist neben dem Kollagenmeniskus die einzige Option größere Meniskusdefekte zu ersetzen, wobei sich bei Allgrafts Kosten, Verfügbarkeit und Abstoßungsreaktionen als problematisch erweisen (Kohn et al., 2011; Messner, 1994b; Scheffler, 2011; Van Arkel and De Boer, 2002). Es kann nach erfolgreicher allogener Meniskustransplantation eine deutliche Verbesserung der Gelenkfunktion sowie eine Reduktion von Schmerzen belegt werden, allerdings nur im kurz- und mittelfristigen Verlauf. Die Mechanik des meniskusintakten Kniegelenks und das Fortschreiten degenerativer Veränderungen können durch eine allogene Transplantation nicht vermieden werden (Scheffler, 2011).

Ebenso Autografts aus körpereigenem Fett, Sehnen oder Perichondrium wurden von den Autoren Goble, Johnson und Kohn verwendet (Goble et al., 1999; Johnson and Feagin, 2000; Kohn et al., 1992). Diese konnten die mechanischen Eigenschaften des Meniskusgewebes allerdings nicht ausreichend nachahmen (Kohn et al., 2011; Martinek and Imhoff, 2008).

2.4 Kenngrößen für einen optimalen Meniskusersatz

2.4.1 Blutgefäßversorgung der Kniegelenkmenisken

Die Menisken besitzen die Aufgabe, Ungleichheiten zwischen den beiden Gelenkflächen im Kniegelenk auszugleichen und spielen bei der (Druck-) Kraftübertragung eine wesentliche Rolle. Sie sind halbmondförmige Fasergelenkknorpel, die im Querschnitt keilförmig sind und auf den flachen überknorpelten Gelenkflächen aufsitzen (Benninghoff, 2003). Die Außenseiten der Menisken sind mit der Innenhaut der Gelenkkapsel verwachsen und werden über diese per Diffusion mit Nährstoffen versorgt (Schiebler, 2007). Durch ihren Flüssigkeitsfilm ermöglicht die Innenhaut eine reibungsarme Bewegung und Grenzflächenschmierung.

Die Randbereiche der Menisken werden von der Synovialmembran bedeckt und sind im äußeren Drittel vaskularisiert, während im inneren Zweidrittel kein vaskuläres Gewebe besteht (Sweigart and Athanasiou, 2001). Daher spricht man, wie in Abbildung 2.1 zu sehen, beim durchbluteten äußeren Drittel des Meniskus auch von der sogenannten ‚Red-red-Zone‘, dem inneren Drittel ohne Durchblutung von der ‚White-white-Zone‘ und beim Übergangsbereich von der ‚Red-white-Zone‘ (Peretti et al., 2001). Die Versorgung der Menisken mit Nerven stellt sich analog dar und beschränkt sich auf das äußere Drittel. Sie unterstützen die propriozeptiven Fähigkeiten des Kniegelenks (Jerosch and Prymka, 1997).

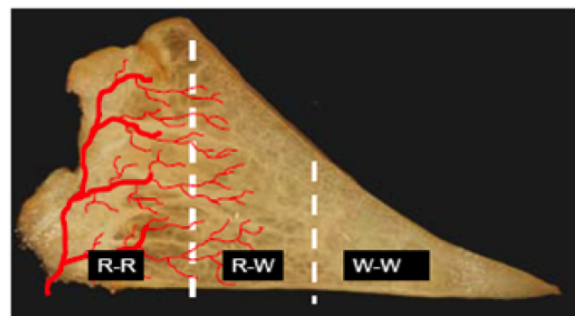


Abbildung 2.1: Sagittaler Schnitt eines Meniskus. Von der Gelenkkapsel her wandern Blutgefäße in die äußeren Randbereiche des Meniskus. Die ‚White-white-Zone‘ beschreibt den inneren Teil ohne Vaskularisation, während die ‚Red-red-Zone‘ Anschluss an das Blutgefäßsystem hat. Der Übergangsbereich wird als ‚Red-white-Zone‘ bezeichnet.

2.4.2 Struktur und Kollagenfasertextur

Unabhängig von der Art des Knorpelgewebes bildet dieses ein Kollagengeflecht, in das Proteoglykane und Glykosaminoglykane über Verbindungen zu einer zentralen Hyaluronsäurekette eingebettet sind (Abbildung 2.2). Das Zusammenspiel der beweglichen (Polysaccharide bzw. Proteoglykane) und unbeweglichen (Kollagen-) Anteile im Knorpel spielt eine wesentliche Rolle für seine einwandfreie Funktion als Stoßdämpfer im Gelenk und für seine damit viskoelastischen Eigenschaften. Die relativ hohe Beweglichkeit der Polysaccharide des Knorpels (der Glykosaminoglykane) kommt dabei im Wesentlichen durch ihre hohe Hydratisierung zustande, die durch die hohe negative Ladungsdichte der Carboxylat- und insbesondere der Sulfatgruppen bedingt ist (Lusse et al., 1995; Schiller, 2004).

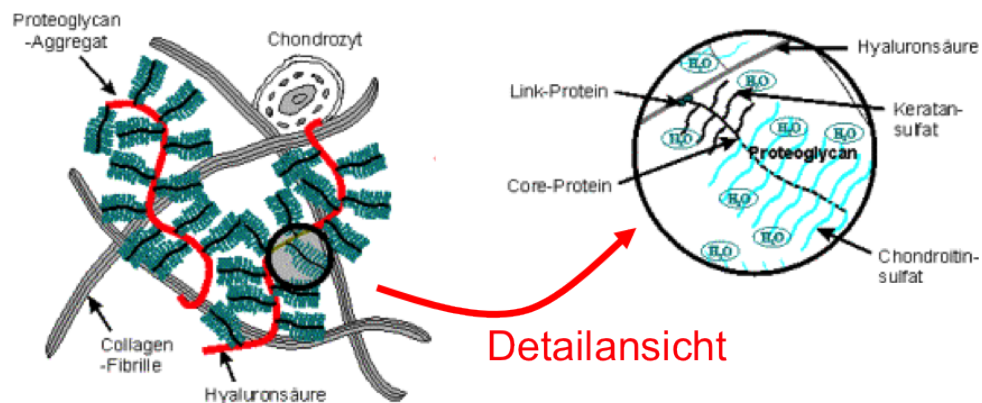


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Organisation der wichtigsten Knorpelbestandteile Kollagen, Proteoglykane und Chondrozyten. Im rechten Ausschnitt ist der schematische Aufbau eines Proteoglycan-Aggregates dargestellt, aus (Schiller, 2004).

Knorpel ist ein dreidimensionales Gewebe, das in mehrere Zonen unterteilt ist. Je nach Beanspruchung weisen die Zonen eine unterschiedliche Zusammensetzung ihrer extrazellulären Matrix (EZM) auf und haben so unterschiedlich mechanische Eigenschaften. Hyaliner Knorpel besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen (GAG), die in ihrer relativen Konzentration stark von der oberen bis zur unteren Zone variiert (Abbildung 2.3) (Schinagl et al., 1997; Nguyen et al., 2011). Die oberflächliche Schicht weist durch einen hohen Kollagen II und niedrigen GAG Anteil ein geringes Druckmodul auf, während die Übergangszone einen geringen Kollagen II Gehalt neben einer erhöhten GAG Konzentration hat und damit ein höheres Druckmodul besitzt. Die untere Schicht des Knorpels besitzt eine noch höhere Kon-

zentration an GAGs und besitzt einen noch geringeren Anteil an Kollagen II Fasern. Schließlich besitzt die verkalkende Knorpelschicht, die den Knorpel in den darunterliegenden Knochen integriert, das höchste Druckmodul, einen maximalen Anteil an GAGs und die geringste Kollagen II Konzentration, dafür einen hohen Anteil an Kollagen X (Bhosale and Richardson, 2008; Einhorn et al., 2007; Poole, 1997).

Meniskus ist ein Knorpelgewebe, dessen EZM hauptsächlich aus Wasser und fibrösen Elementen besteht, in die die Fibrochondrozyten (Meniskuszellen) eingeschlossen sind. Der Wassergehalt des Meniskusgewebes beträgt etwa 74 %, der Kollagenanteil 22 %, die restlichen Komponenten sind Proteoglykane (0,8 % Glykosaminoglykane), sowie Adhäsionsmoleküle und DNA (5,2 %) (Herwig and Buddecke, 1984). Die vorhandenen Kollagene machen 60 bis 70 % des Trockengewichts des Meniskus aus und umfassen die Typen I, II, III, V und VI, wobei Kollagen Typ I mit einem Anteil von etwa 90 % dominiert (Sweigart and Athanasiou, 2001).

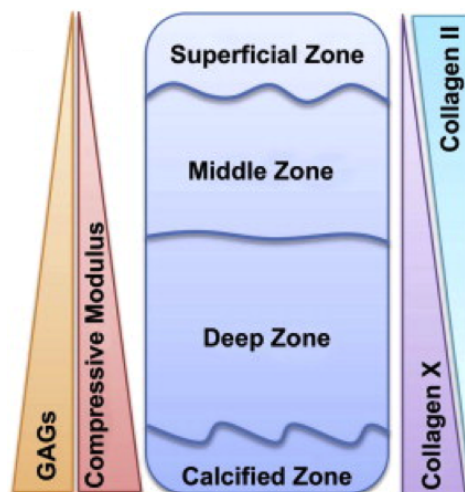


Abbildung 2.3: Anatomie des Gelenkknorpels, aufgezeigt ist die Zunahme an GAGs, des Druckmoduls und dem Kollagen X Anteil sowie der abnehmende Trend des Kollagen II Anteils von der oberflächlichen bis zur verkalkenden Knorpelschicht. Schematische Darstellung aus (Nguyen et al., 2011).

2.4.3 Biomechanische Eigenschaften des Meniskus

Im Kniegelenk werden die hyalinen Gelenkknorpel aufgrund relativ kleiner Kontaktflächen sehr hohen Druckbelastungen ausgesetzt. Zum Ausgleich der Inkongruenz zwischen den Gelenkflächen sind die Menisken dazwischen geschoben, die den Drehbewegungen folgen können und somit die Aufgabe haben, den Druck zwischen Femur- und Tibiakondylen gleichmäßig zu

verteilen (Aumüller et al., 2007). Eine weitere Funktion des Meniskus liegt in der Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia und dadurch in der Dämpfung von Stößen, Kraftübertragung und Stabilisierung des Kniegelenks. Die biomechanischen Eigenschaften der Menisken basieren, wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, auf der gitterartigen Anordnung der Kollagenfaserbündel, deren Zugfestigkeit 50 bis 300 N/mm² beträgt (Lohmann, 2005; Petersen and Tillmann, 1998). Beide Menisken sind jeweils nur am Vorder- bzw. Hinterhorn fixiert, was bei einer Bewegung des Kniegelenks zu Verschiebungen beider Menisken auf dem Tibiaplateau führt. Der Druck, der im Kniegelenk auf die Menisken wirkt, kann ein statischer oder dynamischer Druck sein. Beispielsweise beim Treppensteigen kommt es zu einer statischen Belastung des Tibiaplateaus mit etwa dem Vierfachen des Körpergewichts. Eine dynamische Belastung entsteht hingegen beim Laufen mit etwa dem zwei- bis dreifachen des Körpergewichts. Das Elastizitätsmodul (E-Modul) im Meniskus beträgt zwischen 93 und 294 MPa je nach Belastung und stellt ein Maß für die Widerstands- und Funktionsfestigkeit, als auch für die Funktionsdauer dar. Das Schermodul des Meniskus beträgt 0,13 MPa (Lohmann, 2005; Sweigart and Athanasiou, 2001; Morrison, 1970). Die Neutral-Null-Methode beschreibt die maximale Flexion bzw. Extension des Kniegelenks (Benninghoff, 2003). Eine Drehbewegung des Kniegelenks ist nur in Beugstellung möglich. Bei einem ruckartigen Strecken aus der Dreh- bzw. Beugstellung können die Menisken nicht rechtzeitig zurückgleiten und werden von den Femur- bzw. Tibiakondylen eingeklemmt, wobei durch zu starke Kraftwirkung und damit überschrittene Widerstandsfähigkeit ein Riss im Meniskus entstehen kann.

2.5 Tissue Engineering für suffizienten Meniskusersatz

Die Kenngrößen anhand des biologischen Gewebes lassen die Komplexität des Meniskus erkennen. Im Vergleich zu anderen muskuloskelettalen Geweben, wie Knochen oder Knorpel, gibt es nur eine geringe Anzahl an Studien, die sich mit dem Versuch des Tissue Engineering von Meniskusgewebe befassen. Das Vorkommen mehrerer Zelltypen im Meniskus und seine unterschiedlich strukturierte EZM, die sich je nach Bereich aus unterschiedlichen Komponenten zusammensetzt, sind große Herausforderungen, den Meniskus erfolgreich *in vitro* herzustellen (Sweigart and Athanasiou, 2001).

Arbeiten, suffiziente Meniskusersatzimplantate zu entwickeln, bedienen sich an der Methode des Tissue Engineering, wobei Meniskuscaffolds mit unterschiedlichen Zelltypen besiedelt, oder auch Wachstumsfaktoren zugegeben werden, um ein besseres Meniskusregenerat zu

schaffen. Versuche mit Benetzung und ggf. Konditionierung der Scaffolds mit beispielsweise mesenchymalen Stammzellen (Angele et al., 2008; Walsh et al., 1999; Zellner et al., 2010) oder autologen Meniskuszellen (Baker et al., 2009b; Kang et al., 2006) in Tier- oder *in vitro* Versuchen erbrachten gute Ergebnisse. Neben den Ansätzen mit zellbesiedelten Trägerstrukturen, eignen sich auch azelluläre Biomaterialien für den Aufbau von Ersatzgewebe (Aufderheide and Athanasiou, 2005; Sandmann et al., 2009). Ein weiterer Therapieansatz ist die weitere Verbesserung der Biomaterialien. So könnten z. B. elektrogewebene Scaffolds zu verbesserten dreidimensionalen Eigenschaften der Scaffolds führen und so die Integration der Zellen und die Gewebequalität optimieren (Baker et al., 2009a).

2.5.1 Prinzip Tissue Engineering

Das Tissue Engineering beschäftigt sich mit dem Aufbau von funktionellem Gewebe *in vitro*, das sowohl als Implantat, zur Unterstützung der Geweberegeneration oder als Testsystem für toxische Substanzen, Chemikalien und weitere Bereiche der Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt werden kann.

Gewebe und Organe bestehen aus spezifischen Zellen, die sich in einem komplexen molekularbiologischen Gerüst, der EZM, befinden. Im Tissue Engineering werden zunächst Gewebeproben eines Organismus (menschlich oder tierisch) entnommen und aus diesen gewebespezifische Zellen isoliert und *in vitro* expandiert. Die expandierten Zellen werden anschließend auf verschiedenste Trägerstrukturen, die den Zellen eine Oberfläche und ein Netzwerk zur Adaption, Proliferation und Synthese der EZM bieten, besiedelt. Die Scaffolds stellen dabei nicht nur eine geeignete dreidimensionale (3D) Trägerstruktur für die Zellen, sondern auch für Wachstumsfaktoren und andere biologische Botenstoffe dar. Nach der Zellbesiedelung wird das Gerüst durch die Zellen und ihre Syntheseprodukte ersetzt, wobei es im Verlauf zu einer Resorption des Biomaterials kommt. Idealerweise findet die Zelldifferenzierung, bzw. Matrixsynthese synchron mit dem Abbau des Biomaterials statt (Kreuz et al., 2011). Eine Vielfalt an 3D bioabbaubaren Trägerstrukturen werden als künstlicher Ersatz für die EZM verwendet. Das Kultivieren eines zellbesiedelten Scaffolds zu einem funktionellen Gewebe findet oftmals *in vitro* in einem dynamischen Kultursystem, einem sogenannten Bioreaktor, statt. In einem solchen Bioreaktor können natürliche Umgebungsbedingungen, die *in vivo* auftreten, wie beispielsweise mechanische Belastungen, simuliert werden. Das Prinzip des Tissue Engineerings ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

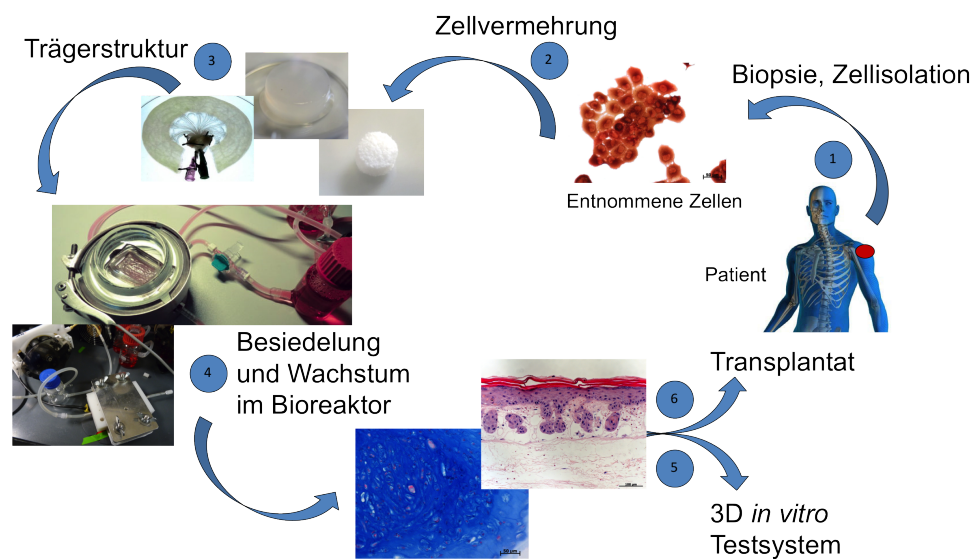


Abbildung 2.4: Grundprinzip des Tissue Engineerings: 1. Entnahme einer Gewebeprobe und Zellisolation, 2. Zellexpansion, 3. Besiedelung der Zellen auf eine Trägerstruktur und 4. Kultivierung des Gewebeersatzmodells im Bioreaktor, 5. Verwendung als Implantat oder 6. als Testsystem.

2.5.2 Aufbau von Implantaten

Die Entwicklung von Implantaten mittels Tissue Engineering zielt auf eine möglichst hohe Integrationsfähigkeit und gute biomechanische Eigenschaften ab. Dabei kann durch die Verwendung körpereigener Zellen die Problematik möglicher Abstoßungsreaktionen umgangen werden. Auch die Auswahl einer geeigneten Trägerstruktur für die Zellen ist wichtig, da das Scaffold als Ersatz für die EZM gilt und größtenteils für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlich ist. Es werden synthetische von natürlichen Biomaterialien unterschieden.

Synthetische Biomaterialien als Meniskusersatz

Ein Beispiel für ein synthetisches Scaffold, welches als Meniskusersatz in Kaninchen getestet wurde, ist poröses Polyurethan (Klompaker et al., 1992, 1996b,a). Die Ergebnisse waren vielversprechend, es konnte Kollagen Typ I und II nachgewiesen und eine Degeneration des Materials festgestellt werden. Allerdings erfolgten keine biomechanischen Tests (Klompaker et al., 1996b). Ein wichtiger Aspekt, der bei der Herstellung von synthetischen Materialien

beachtet werden muss, ist die Porengröße, um ein Einwandern des Gewebes und der Zellen in das Material zu begünstigen. Die optimale Porengröße für ein aromatisches Polyurethanmaterial scheint zwischen 150 und 500 μm zu sein, geringere Porengrößen sind nicht fördernd (Klompaker et al., 1993). Neben den aromatischen Polyurethanen, die toxische Partikel während ihrer Degeneration abgeben, erfolgte die Testung von aliphatischen Polyurethanen, bei denen eine 80 bis 100 %ige Einwanderung von fibrösem Gewebe zu erkennen war. Ein Problem jedoch besteht in ihrer geringen Scherfestigkeit, die zur Ursache einer Implantatlockerung werden könnte und die durch komplexe Nahttechniken nicht vollständig behoben werden kann (de Groot et al., 1996).

Als weitere Trägerstruktur erfolgte die Verwendung eines Teflonnetzes, welches an die Stelle einer Totalmeniskektomie genäht wurde und dem umliegenden Gewebe ein Infiltrieren des Scaffolds über 12 Monate erlaubte. Im Vergleich zu den Versuchen ohne das Teflonnetz, konnte bei den *in vivo*-Studien im Hund durch das Einnähen des Netzes eine geringere Degeneration des Knorpels festgestellt werden. Dennoch waren die Ergebnisse nicht sehr erfolgversprechend (Toyonaga et al., 1983).

Veth et al. führten Studien mit reinen Kohlenstofffasern, reinen Poly-L-Lactat-(PLLA) Fasern, oder eingebetteten Kohlenstoff- bzw. PLLA-Fasern in Polyurethan-Poly(L-lactid)-Scaffolds als Meniskusersatz durch. Die Scaffolds lieferten im Kurzzeitversuch gute Ergebnisse, allerdings wurden keine biochemischen oder biomechanischen Analysen durchgeführt (Veth et al., 1983, 1986).

Ein 50/50 Copoly(L-lactid/e-capralacton)-Scaffold stellt ein weiteres vielversprechendes synthetisches Biomaterial in seiner Verwendung als Meniskusersatz dar. Erforscht wurden hierbei Scaffolds mit unterschiedlichen Kompressionsmodulen, wobei das Scaffold mit 40 kPa kein fibröses Gewebewachstum zeigte, während die mit 100 kPa eine 50 bis 70 %ige Gewebewanderung aufwies. (de Groot et al., 1997)

Scaffolds aus Polyglykolsäure (PGA) oder Polylactid-co-Glycolid (PLGA) wurden von der Gruppe Ibarra et al. als Meniskusimplantat im Schafmodell verwendet. Bevor das mit Zellen vorbesiedelte Scaffold im Defekt eingesetzt wurde, erfolgte aufgrund der geringen mechanischen Eigenschaften eine subkutane Implantation der Materialien für eine bestimmte Zeit. Nach 6-wöchiger *in situ*-Implantation erfolgte die Erhaltung eines proteoglykanreichen Gewebes mit einer organisierten Kollagenfasertextur (Ibarra et al., 1997, 2000).

Natürliche Biomaterialien und Anwendungen

Es gibt neben der großen Vielfalt an synthetischen Materialien nur wenige Studien, die mit natürlichen Biomaterialien durchgeführt wurden. Allerdings haben beispielsweise die natürlichen Kollagen-Scaffolds bereits einen höheren Entwicklungsstand erreicht, als die synthetischen. Kollagene tierischen Ursprungs bieten eine ausreichende Primärstabilität im wässrigen Medium, sie benötigen keine zusätzlichen chemischen Substanzen und sind frei von zelltoxischen Inhaltsstoffen.

Walsh et al. besiedelte in seiner Studie Kollagen Typ-I-Schwämme mit autologen Stammzellen und erzielte mit dem Einsatz des besiedelten Scaffolds als Meniskusersatz in einem Kaninchenmodell gute histologische Ergebnisse. Jedoch waren bereits nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten degenerative Veränderungen, begründet durch eine geringe biomechanische Belastbarkeit, nachweisbar (Walsh et al., 1999).

Sowohl Typ-I Kollagen-GAG Scaffolds aus bovinem Kollagen und Chondroitin-6-Sulfat als auch Typ-II Kollagen-GAG Scaffolds (Chondrocell von Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Ch) wurden von Müller et al. mit primären Meniskuszellen besiedelt. Nach drei Wochen Kultur wurde eine meniskusähnliche Zellmorphologie und -dichte in beiden Biomaterialien beobachtet, allerdings wurden keine mechanischen Tests an den Ersatzgeweben durchgeführt (Müller et al., 1999).

Die besten Ergebnisse wurden bei der Verwendung eines Kollagen-GAG Co-Polymers erzielt, das von Rodkey et al. entwickelt wurde. Das Kollagen-Scaffold, isoliert aus bovinen Sehnen, die peripher ausgerichtet sind, ist bereits in der klinischen Studie der Phase II (Rodkey et al., 1999). In den Tierstudien wurden 80 % des medialen Meniskus im Hund entfernt und durch das Scaffold ersetzt (Stone et al., 1992). In Phase I und II der klinischen Studien wurden die beschädigten Teile des Meniskus abgetrennt, das Scaffold auf die entsprechende Größe getrimmt und eingenäht, wobei der zu ersetzende Bereich zwischen 35 % and 85 % des ganzen Meniskus variiert (Rodkey et al., 1999; Stone et al., 1997). Nach drei Jahren wurde keine Degeneration des Gelenknorpels festgestellt und die Ergebnisse sehen vielversprechend aus (Rodkey et al., 1999; Stone et al., 1997).

Eine weitere, natürliche Trägerstruktur stellt das Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc®) dar (Mertsching et al., 2005). Dabei handelt es sich um ein kurzes Stück eines Schweinedünndarms mit erhaltenem Blutgefäßsystem, das mit einem arteriellen sowie venösen Anschluss explantiert wird. Die bestehende Kollagendarmmatrix sowie die Blutgefäße werden chemisch sowie enzymatisch azellularisiert, um ein azelluläres Trägergerüst zu erhalten, welches sich mit Zellen rebesiedeln lässt (Reboredo et al., 2013). Durch eine erfolgreiche Rebesiedelung des Kapillarsystems kleiden Endothelzellen die Blutgefäße neu aus und versorgen *in vitro* das Lumen des Schweinedünndarms und somit das Ersatzgewebe *in vivo* mit Nährstoffen (Mertsching

et al., 2005, 2009; Hansmann, 2005). Die Kultivierung des Ersatzgewebes erfolgt dynamisch in einem Bioreaktorsystem, in welchem physiologische Kultivierungsbedingungen gewährleistet sind. Der physiologische Blutfluss des zu kultivierenden vaskularisierten Gewebes lässt sich *in vitro* durch einen pulsatilen Medienfluss simulieren. Die erste erfolgreiche Implantation der azellulären und biokompatiblen BioVaSc[®] am Menschen erfolgte als Tracheaersatz (Macchiarini et al., 2004).

Badylak et al. verwendete für seine Studien ebenfalls ein Stück der Dünndarmsubmucosa (SIS), die er aus Schweinen gewinnen konnte. Durch die Vaskularisation und Zellbesiedlung bildet sich nach der Implantation ein dem Umgebungsgewebe ähnliches Konstrukt, allerdings bietet die SIS noch nicht das 3D Grundgerüst und die notwendigen biomechanischen Voraussetzungen für einen kompletten Meniskusersatz. Momentan wird das Biomaterial vor allem zur Rekonstruktion von Sehnen im orthopädischen Sektor eingesetzt (Badylak, 2007; Kreuz et al., 2011).

Neben der azellularisierten Schweinedarmmatrix gibt es Studien, in denen azelluläre Meniskuscaffolds, die durch chemische Azellularisierung aus Allografts gewonnen werden, als Trägerstruktur dienen. Der Vorteil dieser Scaffolds ist die Erhaltung der biomechanisch wichtigen EZM bei gleichzeitiger Reduzierung der Zelltoxizität durch Zellentfernung (Kreuz et al., 2011). Bislang konnten sowohl humane als auch tierische Menisci erfolgreich dezellularisiert werden (Sandmann et al., 2009; Stabile et al., 2010; Stapleton et al., 2011). Sandmann et al. azellularisierten humane Menisci durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und erzielten dabei ein ähnliches biomechanisches Verhalten wie bei intakten Menisci. Die histologischen Untersuchungen des Konstrukts ergaben eine mit dem intakten Meniskus vergleichbare Kollagenstruktur (Sandmann et al., 2009). Durch einen Enzymverdau wurden Menisci vom Schaf azellularisiert, wobei eine höhere Steifigkeit bei besserer Komprimierbarkeit im Vergleich zu nativen Menisci erzielt wurde, jedoch die EZM nicht vollständig erhalten blieb (Maier et al., 2007). Stabile et al. halbierte in einer Schafstudie den Meniskus, dezellularisierte die eine Hälfte und verglich sie mit der anderen Intakten. Hierbei wies das bearbeitete Konstrukt größere Poren bei ansonsten vergleichbaren biomechanischen Eigenschaften auf (Stabile et al., 2010). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die Konstrukte ein gutes Einwachsen humaner Fibroblasten aufzeigen, was an Mäusen nach subkutaner Implantation getestet wurde, und sie kein autoimmunes Potenzial aufweisen (Stapleton et al., 2011). Im Rattenmodell zumindest ermöglichten mit mesenchymalen Stammzellen besiedelte azelluläre Meniskuscaffolds eine bessere Knorpelprotektion als unbesiedelte Zellträger (Yamasaki et al., 2008).

Neben den reinen natürlichen oder synthetischen Materialien, die erforscht wurden, lassen sich wenige Arbeiten mit Komposit-Materialien finden, die aus zwei oder mehreren verbundenen Materialien bestehen. Angele et al. verwendete beispielsweise ein Hyaluronsäure-/Gelatine-Kompositcaffold als Meniskusersatzmaterial, das mit autologen mesenchymalen Stammzellen

besiedelt wurde. Dieses Implantat zeigte nach drei Monaten einen erhöhten Anteil an meniskustypischem Faserknorpel, nachdem es bei Kaninchen implantiert wurde (Angele et al., 2008; Kreuz et al., 2011).

2.5.3 Entwicklung von 3D Testsystemen

Testsysteme stellen Alternativen zum Tierversuch dar, die beispielsweise nach dem EU-Verbot von Tierversuchen für Kosmetika, das am 11. März 2013 in Kraft trat, für die Industrie von großer Bedeutung sind.

3D *in vitro*-Testsysteme werden oftmals auf Basis von Kollagen Typ I Hydrogelen aufgebaut. So kann beispielsweise ein vom Fraunhofer IGB komplex entwickeltes Hautmodell mit natürlicher Haut physiologisch verglichen werden. Es ermöglicht unter anderem die Prüfung von neuen Wirkstoffen sowie deren Wirksamkeit und dient unter anderem auch als Tumor- und Infektionsmodell, sowie für Wundheilungsstudien (Weimer, 2006; Walles et al., 2007). Dadurch können mit Hilfe des 3D Hautmodells Risiken von chemischen und externen Faktoren sowie die Biokompatibilität von Medizinprodukten beurteilt werden.

Ein weiteres Testsystem stellt die azellularisierte, biokompatible BioVaSc[®] Trägerstruktur dar, auf deren Basis ein funktionelles, vaskularisiertes Lebermodell aufgebaut werden konnte. Dieses kann bei Medikamententests zum Einsatz kommen und den Abbau von Wirkstoffen auf toxische Substanzen hin untersuchen (Schanz et al., 2010).

Die Dünndarmsubmucosa (SIS-muc) der BioVaSc[®] kann ebenso auch ohne die Gefäßanschlüsse als biologische Trägerstruktur für beispielsweise den Aufbau eines 3D Darmmodells oder Tumormodells verwendet werden (Pusch et al., 2011; Reboredo et al., 2013). Dabei beeinflusst die 3D Struktur des Scaffolds die Differenzierung der verwendeten Zelltypen in die Zielzellen und spiegelt die physiologischen Eigenschaften wider. Im Gegensatz zu konventionellen 2D Zellkultursystemen, stellen 3D Kultursysteme *in vitro* physikalisch unterstützende Trägerstrukturen dar. Demnach wird die Verwendung von biotechnologisch hergestellten 3D Trägermaterialien zunehmend als der erfolgversprechendste, experimentelle Ansatz gewertet natürliche, strukturierte und funktionelle Gewebeeigenschaften zu regenerieren.

2.6 Das Elektrosponning als ein biotechnologisches Herstellungsverfahren von 3D Trägermaterialien

Wie bereits in Kapitel 2.5 erwähnt, kann das Elektrosponning zu verbesserten dreidimensionalen Eigenschaften von Trägermaterialien führen und so die Integration der Zellen und die Gewebequalität optimieren (Baker et al., 2009a). Mittels der Elektrosponning-Methode ist es möglich, aus Polymerlösungen Fasern und strukturierte Scaffolds unterschiedlicher Art mit spezifischen Funktionalitäten herzustellen (Truong et al., 2012). Neben synthetischen Polymeren können auch Kollagene zur Herstellung von elektrogenesponnenen Trägermaterialien verwendet werden, die ein Zellwachstum neben ausreichender mechanischer Unterstützung erlauben. Beim Prozess entstehen typischerweise Fasern mit Durchmessern kleiner 1000 nm, die auch als Nanofasern bezeichnet werden. Nanofasern sind attraktive Substrate für Anwendungen in der Geweberegeneration, da sie EZM-Strukturen simulieren. Elektrosponning ist bekannt als eine der effizientesten Techniken, um Polymer-Nanofasern zu erzeugen. Neueste Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass Zellreaktionen, wie z. B. Adhäsion, Proliferation und Differenzierung, durch die Abstimmung der Eigenschaften der Nanofasern beeinflusst werden (Kai et al., 2013).

Bei der Methode Elektrosponning wird die Polymerlösung an einer Elektrode dosiert und durch das elektrische Feld von der Elektrode abgezogen und beschleunigt. Dabei entsteht in einem komplexen Prozess die Aufspaltung der Polymerlösung in kleine und kleinste Fasern und Gespinste, die sich schließlich auf der Gegenelektrode als eine Art Vlies ablagern (Greiner and Wendorff, 2007; Wendorff and Greiner, 2012). In Abbildung 2.5 sind schematisch zwei mögliche Varianten einer Elektrosponning Apparatur dargestellt. Abbildung 2.5 (A) zeigt den typischen vertikalen Aufbau, wobei die Spritze von oben auf den Kollektor gerichtet ist und die Austrittsgeschwindigkeit der Polymerlösung über die Gravitationskraft bestimmt wird. Bei der in Abbildung 2.5 (B) gezeigten horizontalen Apparatur wird die Polymerlösung mit Hilfe einer Spritzenpumpe befördert. Hierbei ist der Kollektor, flach oder eine Welle, auf der Höhe der Pumpe aufgestellt.

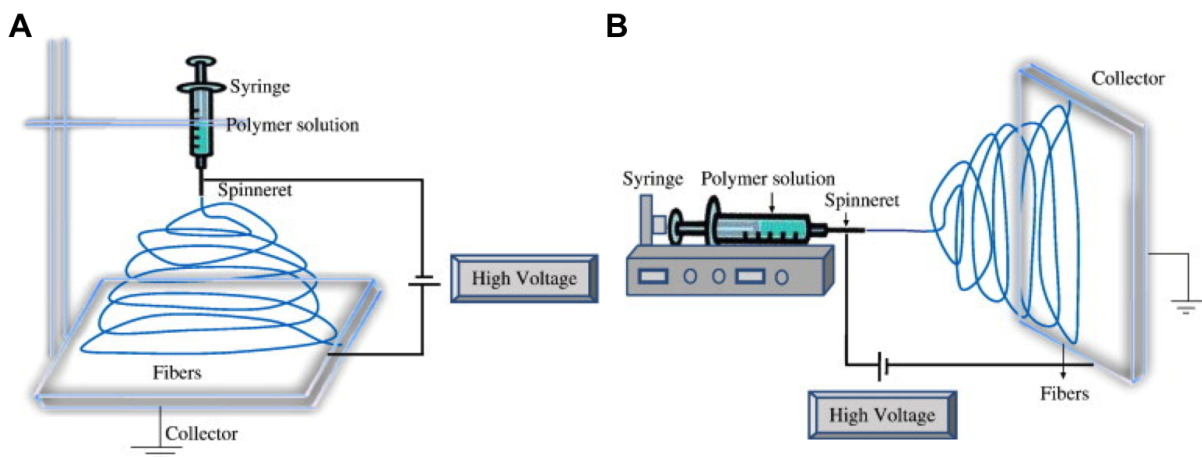


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau einer Elektrospinning Apparatur. (A) Typischer vertikaler Aufbau und (B) Horizontaler Aufbau, aus (Bhardwaj and Kundu, 2010).

Das Ergebnis des Elektrospinnens ist kaum vorhersagbar. Das Erreichen des gewünschten Zielprodukts erfolgt daher empirisch durch eine aufwendige Optimierung der Parameter, wie Ladungsdichte, Viskosität und Oberflächenspannung, die maßgeblich Einfluss auf die Morphologie der Fasern und dessen Durchmesser haben (Liu et al., 2012a).

2.7 Stammzelltherapie und Differenzierungspotential von Stammzellen

Die Stammzelltherapie findet schon seit vielen Jahren bei der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen, wie z. B. bei Leukämien, Anwendung. In der klinischen Praxis werden für diese Therapien ausschließlich hämatopoetische Stammzellen verwendet. Diese multipotenten Blutstammzellen sind körpereigene Zellen (autologe Transplantation) oder die eines Spenders (allogene Transplantation). Seit den 1990er Jahren wurden jedoch viele weitere Stammzellen entdeckt, isoliert und charakterisiert. Sie können zum einen aus embryonalem (pränatalem) Gewebe, zum anderen aus adultem (postnatalem) Gewebe isoliert werden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, während adulte Stammzellen ein eingeschränkteres Differenzierungspotential besitzen. Im Rahmen von klinischen Studien wurden bereits andere, nicht blutbildende Stammzellen übertragen, etwa mesenchymale Vorläuferzellen (MSZ). MSZ

haben in der Forschung große Beachtung gefunden und dienen häufig als Zellquelle für den Aufbau von 3D *in vitro* Gewebe-Konstrukten, die in muskuloskelettalen Defekten Einsatz finden sollen. Im Jahr 1968 wurden MSZ erstmals aus Knochenmark isoliert und als Fibroblasten mit der Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung beschrieben. Heute gibt es eine Vielzahl an Gewebe wie Muskel, Fett, Blut, Periost, Zahnpulpa, Lunge und Knochen als Quelle für die MSZ, wobei Knochenmark oder Fettgewebe zumeist aus Gründen der Zugänglichkeit genutzt werden. Wie andere Vorläuferzellen, weisen sie ein hohes Proliferations- und Selbsterneuerungspotential auf, d. h. sie besitzen eine permanente Telomerase-Aktivität und unterliegen damit nicht dem Alterungsprozess bei Zellteilungen, wie es bei differenzierten Zellen der Fall ist. Ein weiteres Merkmal dieses Typs von Vorläuferzellen ist die Fähigkeit, sich zu einer Vielzahl von Gewebezellen zu differenzieren. Mögliche Zielzelltypen sind Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myoblasten, Stromazellen sowie Fibroblasten (Park et al., 2011; Wintermantel and Ha, 2009).

Es wurden umfangreiche Antigen-Profile von MSZ erstellt, um diese zellbiologisch zu charakterisieren, die in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind (Lanza, 2009).

Tabelle 2.1: Oberflächenmarker für die Stammzellpopulation

Expression	Oberflächenmarker
positive, vorhandene Marker	CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105, CD146, CD166
negative, nicht vorhandene Marker	CD3, CD4, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD34, CD38, CD45, CD56, CD61, CD62P, CD104, CD144

Es zeigte sich, dass es je nach Herkunft der MSZ Abweichungen der Expressionsmarker gibt. Während aus Knochenmark gewonnene MSZ positiv für STRO-1 und CD106 (Cluster of Differentiation 106) und negativ für CD49d sind, verhalten sich hier Vorläuferzellen aus Fettgewebe gegenteilig. Daher wird davon ausgegangen, dass es sich bei MSZ um eine heterogene Zellpopulation handelt, deren Zellen ein unterschiedliches Maß an Differenzierungsfähigkeit und Plastizität aufweisen (Wintermantel and Ha, 2009).

Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) hat aufgrund des komplexen Musters an Antigenen zum Nachweis von MSZ folgende Charakterisierung vorgeschlagen. Die Faktoren CD73, CD90 und CD105 müssen von mindestens 95 % der Zellen exprimiert werden, während mindestens 98 % der Zellen für CD14, CD35, CD45, CD79 α und HLA-DR negativ sein müssen. Außerdem zeigen MSZ laut Definition die Fähigkeit der Adhäsion unter Standardkulturbedingungen und können durch spezifische Färbungen nach der Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten dargestellt werden (Artmann et al., 2011).

Der Ursprung aller Chondrozyten sind MSZ. In ihrem frühen Entwicklungsstadium kondensieren und differenzieren die MSZ in Matrix-produzierende Chondroblasten. Wechselwirkungen mit umliegenden Matrixkomponenten haben sich als wichtiger Anreiz für die Zellweiterentwicklung in reife Chondrozyten erwiesen (Day et al., 2005; Lüllmann-Rauch, 2009; Quintana et al., 2009). Ein komplexes Wechselspiel von Signalmolekülen wurde bereits identifiziert, so dass Proliferations- und Differenzierungsfaktoren *in vitro* aufeinander abgestimmt werden können, um entweder die Zelle im Knorpelstatus zu erhalten oder diese in die Knochenbildung zu lenken. Bevor die Zellen das zuletzt genannte Stadium, die sogenannte enchondrale Ossifikation, erreichen, differenzieren die Chondrozyten zunächst in übergroße hypertrophe Chondrozyten (Goldring et al., 2006).

Die Marker, die zur Bestimmung der spezifischen Differenzierungsphasen herangezogen werden, sind in Abbildung 2.6 dargestellt. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Entwicklung von Faserknorpel. Die beschriebenen Marker sind identifizierte Gelenkknorpelmarker und werden im Rahmen dieser Arbeit unter Vorbehalt auf Faserknorpel übertragen.

Kollagen Typ II und Aggrecan sind knorpelspezifische Strukturproteine, die in der EZM des hyalinen Knorpels vorkommen. Erreichen chondrogen differenzierte MSZ, beispielsweise mit Hilfe von spezifischen Wachstumsfaktoren, den Differenzierungsstatus von Chondroblasten, exprimieren diese die beiden Marker.

Der frühe Chondrozytenmarker Sox9 ist ein Schlüsseltranskriptionsfaktor, der ebenfalls von differenzierten MSZ, die sich im chondrogenen Vorläuferstatus und Chondroblastenstatus befinden, exprimiert wird. Durch die Unterdrückung der Vaskularisierung und Blockierung der Endothel Wachstumsfaktor (VEGF)-Expression, bleibt der chondrogene Differenzierungsstatus erhalten und die Zellen differenzieren nicht weiter zu Osteoblasten, was den Marker für die Chondrozyten Festlegung essenziell macht (Day et al., 2005; Hattori et al., 2009). Bei der Generierung von hyalinem Knorpelgewebe ist die Festlegung unbedingt zu beachten, während bei der Generierung eines Meniskusfaserknorpels die Teilvaskularisierung und somit auch die enchondrale Ossifikation, zumindest am Rand des Gewebes, erwünscht ist.

Erreichen die Chondrozyten den Status einer Hypertrophie, zeigen sie eine negative Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 und dafür eine Hochregulierung von RunX2, ein Transkriptionsfaktor, der für die frühe Osteoblastendifferenzierung bekannt ist. Die Osteoblastendifferenzierung kann durch den Sox9-Faktor gehindert werden, da er die RunX2-Expression kontrolliert (Dy et al., 2012). Befinden sich die differenzierten MSZ bereits im fortgeschrittenen Osteoblastenstatus, führt die Expression von RunX2 weiter zur Kollagen Typ X (Kol X) Synthese der Zellen (Akiyama, 2008; Day et al., 2005; Zuscik et al., 2008). Kol X ist ein netzbildendes Matrixprotein, das von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und einen großen Anteil der EZM der untersten, verkalkenden Knorpelzone ausmacht. Gleichzeitig zieht eine erhöhte

VEGF-Konzentration Osteoblasten und Endothelzellen an, was zur Einwanderung von Blutgefäßen führt (Pufe et al., 2005).

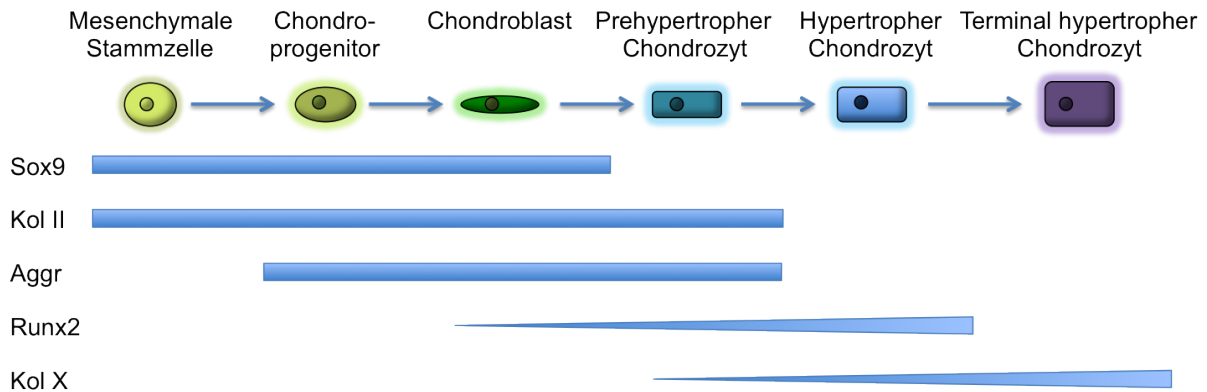


Abbildung 2.6: Eine Auswahl an Markern, die spezifische Stadien der Chondrogenese festlegen. Das Expressionsmuster der verschiedenen Faktoren hilft das Entwicklungsstadium zu bestimmen, modifiziert aus (Zuscik et al., 2008).

Der Differenzierungsprozess kann durch spezifische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Jaiswal et al., 2000; van Osch et al., 2002), als auch durch biophysikalische Stimulationen (Chen et al., 2003; Simmons et al., 2003) und die Bereitstellung einer geeigneten 3D Umgebung gesteuert werden (Lisignoli et al., 2001; Sohier et al., 2008). Für den Einsatz im muskuloskelettalen Tissue Engineering sind MSZ besonders interessant, da sie eine Reihe von Eigenschaften aufweisen. Dazu gehört die Absonderung von bioaktiven Molekülen, die Inhibierung der Apoptose umliegender Zellen, die Verminderung von Narbenbildung und Fibrose bei verletzten Geweben und die Anregung von Angiogenese und damit auch die Fähigkeit, neue Blutversorgung herstellen zu können (Wintermantel and Ha, 2009). MSZ stimulieren über sekretorische Faktoren die Zellteilung gewebsspezifischer Vorläuferzellen (Pallua and Suschek, 2011).

2.8 Angiogenese und die Rolle der mikrovaskulären Endothelzellen

Die Bedeutung der Blutgefäße in der Bildung des Skelettes und der Knochenheilung wurde bereits im 18. Jahrhundert belegt (Hunter, 2007). Von der Blutversorgung und damit auch von Endothelzellen sind nahezu alle Körpergewebe abhängig. Durch das Erweitern oder Wiederauf-

bauen des Gefäßsystems ermöglichen die Endothelzellen so das Wachstum und die Heilung von Geweben (Alberts et al., 2003; Augustin, 2004). Sie regulieren den Austausch von Blutstrom und dem umliegenden Gewebe, behalten zeitlebens die Fähigkeit zur Zellteilung und können ihre Anordnung und Anzahl den Gegebenheiten ihrer Umgebung anpassen (Alberts et al., 2003). Arterien und Venen besitzen eine Wand aus Bindegewebe und glatter Muskulatur, deren Durchmesser größenabhängig ist und deren Innenseite stets von Endothelzellen bedeckt ist. Kleinere Gefäße wie Kapillaren und Sinusoide dagegen besitzen keine Muskel- und Bindegewebsschicht und bestehen nur aus einer Basallamina und Endothelzellen. Untersuchungen der Embryonalentwicklung zeigen, dass große Gefäße zunächst aus solchen sehr kleinen Kapillaren entstehen und Bindegewebe und Muskeln erst zu einem späteren Zeitpunkt durch lösliche Faktoren, produziert von Endothelzellen, rekrutiert werden (Alberts et al., 2003).

Die größte Hürde bei der Entwicklung von großen, komplexen Geweben im Tissue Engineering ist die Gewährleistung der Lebensfähigkeit der Konstrukte *in vitro* und *in vivo*. Implantate müssen *in vivo* vaskularisiert werden, um das Überleben, deren ausreichenden Versorgung und Integration zu sichern (Folkman and Hochberg, 1973; Goldstein et al., 2001). Diffusion ist eine Möglichkeit der Zellversorgung, jedoch kann hier nur eine Versorgung bis auf eine maximale Tiefe von 200 μm im Gewebe oder Scaffold erreicht werden (Klepetko et al., 2004; Glatz et al., 2003). Zur Erhaltung eines neu aufgebauten Gewebekonstrukts ist es daher notwendig, neue Blutgefäße aus schon vorher vorhandenen Gefäßen ausbilden zu lassen. Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der von der Anwesenheit der EZM, sowie der Migration und mitogenen Stimulation von Endothelzellen abhängig ist und eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Bewegungsapparates und der Knochenbruchheilung spielt (Novosel et al., 2011; Kanczler and Oreffo, 2008). Neue Gefäße entstehen immer aus Kapillaren durch Aussprossung aus von bestehenden Kapillaren. Die Gefäßneubildung setzt als Antwort auf spezifische Signale ein, bei der Endothelzellen lange Fortsätze bilden, die die Entwicklung der Sprossung beim Einwachsen in umliegendes Gewebe steuern. Die Zellen bilden zunächst einen dichten Spross, der durch das Verschmelzen der Vakuolen benachbarter Endothelzellen zu einer Röhre umgestaltet wird, die als Kapillarkanal dient (Rücker, 2011).

Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und VEGF, die von Makrophagen und Endothelzellen in der hypoxischen und sauren Umgebung des Implantats freigesetzt werden, stimulieren das Wachstum neuer Kapillaren in den Geweben, die somit mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Ribatti et al., 2000; Ahrendt et al., 1998; Shweiki et al., 1992; Nomi et al., 2002). Als ein spezifisches Mitogen der Endothelzelle fördert VEGF die Differenzierung und Proliferation der Zelle, was zur Ausbildung von unausgereiften Gefäßen führt (Ribatti et al., 2000). Weiter wirken saure und basische FGFs (aFGF, bFGF), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β) und Angiopoietine mit (Wenger et al., 2004).

Ein kritischer Faktor, beispielsweise nach der Knochenimplantation, ist die Revaskularisierung des Implantats. Ohne sie degeneriert das Gewebe und wird nekrotisch (Schmid et al., 1997). Einige Strategien wurden dazu entwickelt und erforscht, wie z. B. die indirekte Revaskularisation. Bei diesem Konzept wird das aufgebaute Gewebekonstrukt mit vitalem Gewebe umwickelt und das Einwachsen von Mikrogefäßen angeregt (Wallis, 2004; Eiselt et al., 1998; Cebotari et al., 2002). In diesem Ansatz entwickeln sich die neuen Kapillaren aus den umliegenden Geweben, veranlasst durch eine entzündliche Wundheilungsantwort als eine Reaktion zur chirurgischen Implantation (Jain, 2003). Jedoch fördert diese Reaktion nicht die Neoangiogenese im implantierten Konstrukt.

Als Voraussetzung für die Herstellung von komplexen und funktionellen humanen Gewebeäquivalenten dokumentierte Schanz et al. einen *in vitro*-Angiogeneseprozess in einem von ihnen aufgebauten vaskularisierten Lebermodell (Schanz et al., 2010).

2.9 Anwendung von Bioreaktorsystemen im Tissue Engineering

Experimente im Tissue Engineering zeigten, dass bei der Züchtung von neuem Gewebe viele Signale aus der Umgebung der Zellen den Zustand des Gewebes beeinflussen und es nicht nur der Isolation von Zellen aus einem Zielgewebe und der anschließenden Versorgung mit Nährstoffen in Zellkulturschalen bedarf (Lindahl et al., 2003; Chen and Hu, 2006). Die gewebespezifischen Eigenschaften und die Vitalität eines Gewebes sind *in vitro* stark von den Kulturbedingungen abhängig. In Folge dessen werden Bioreaktoren entwickelt, die grundsätzlich die Aufgabe übernehmen, die *in vivo* Situation zu simulieren. Dabei wächst deren Detaillierungsgrad und die technische Komplexität solcher Systeme stetig an. Die Züchtung unterschiedlicher Gewebe setzt unterschiedliche Reize voraus.

2.9.1 Bioreaktoren allgemein

Frühe Bioreaktormodelle sind von Zellkulturschalen abgeleitet und erfüllten hauptsächlich die Aufgabe, das kultivierte Gewebe mit Nährstoffen zu versorgen oder 3D Strukturen unter dynamischen Kulturbedingungen mit Zellen zu besiedeln. Ein Beispiel ist die Spinnerflask, in der das Medium bzw. die Zellsuspension aktiv in einem Kulturgefäß mittels eines Rührers bewegt

wird (Minuth et al., 2005).

Für die Herstellung eines komplexen Gewebes *in vitro*, welches dicker als ca. 0,2 mm ist, können tiefere Gewebsschichten nicht mehr durch Diffusion allein versorgt werden (Walles et al., 2003). Während beim Knochen-Tissue Engineering die Perfusion bei veränderter mechanischer Deformation der Trägerstruktur eine Rolle spielt, erfolgt die Kultivierung von gezüchteten Hautmodellen unter Air-Lift Kulturbedingungen, um die Zellen zur Ausdifferenzierung anzuregen, die mit der Ausbildung einer Hornschicht an der Grenzfläche resultiert (Kahlig et al., 2013; Rauh et al., 2011; Groeber et al., 2011). Nur so kann funktionelles Gewebe gezüchtet werden, welches dem natürlichen Vorbild entspricht.

Pusch et al. konnten unter kontinuierlichen Flussbedingungen hochprismatisches Zellwachstum der Caco-2-Zelllinie auf einer biologisch azellularisierten Schweinedarmmatrix beobachten, wie sie im Darmgewebe vorzufinden sind. Im Gegensatz dazu konnte diese Art an Zellausrichtung in statischen Modellen nicht festgestellt werden (Pusch et al., 2011).

Der pulsatile Druck ist z. B. ein wichtiger Reiz bei der Herstellung von Gefäßimplantaten. Und zwar besitzen Gefäße, die unter pulsatilem Druck hergestellt werden im Vergleich zu statisch erzeugten, einen wesentlich höheren Maximaldruck. Bei ansonsten gleichen Vorgaben, wie Trägerstruktur und Medium, reißen die dynamisch kultivierten später (Koechlin et al., 1991).

Für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe zeigt sich ein ähnlicher Reiz, der von großer Bedeutung ist, die mechanische Stimulation.

Motiviert durch solche Kenntnisse wird davon ausgegangen, dass zur Kultur von verschiedenen Gewebearten *ex vivo* spezifische Reaktorsysteme zu entwickeln sind. Für deren Auslegung ist es hilfreich, die jeweilige *in vivo* Situation des Gewebes, das nachgebaut werden soll, zu betrachten, aus dieser sich Konsequenzen für den Aufbau eines gewebespezifischen Bioreaktors ableiten. So werden physiologische Kultivierungsbedingungen und die Generierung von vitalem Gewebe *in vitro* ermöglicht (Hansmann, 2010).

2.9.2 Bioreaktoren für das Knorpel-Tissue Engineering

Die grundlegenden Anforderungen an einen Bioreaktor, wie die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Gasen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten, genügen noch lange nicht allen Voraussetzungen zum Aufbau von Gewebe *in vitro*. Fast alle Gewebearten im Körper werden mechanisch beansprucht, womit der Reiz der mechanischen Stimulation von großer Bedeutung ist. Die Bioreaktorsysteme müssen diese gewebetypischen Signale an die Explantate bzw. 2D und 3D Konstrukte übermitteln. Dafür gibt es einige Ursachen-Wirkungsprinzipien von bereits verbreiteten Bioreaktoren, die Schulz et al. beispielhaft für das Knorpel-Tissue

Engineering zusammengestellt hat.

Statisch kultiviert produzieren Knorpelzellen den wenig strapazierfähigen Faserknorpel und nicht den elastischen hyalinen Knorpel (Lindahl et al., 2003). Speziell Knorpel nimmt *in vivo* zyklisch hohe Druckkräfte neben hohen Scherkräften auf. Dieser Faktor ist bei der Kultivierung von Knorpelzellen zu berücksichtigen (Lindahl et al., 2003). Neben Stimuli wie Ultraschall oder Reize durch ein elektrisches Feld können Systeme wie ein zylindrischer Behälter, der sich um seine Längsachse dreht (rotating vessel) zur Kultur von Knorpelkonstrukten verwendet werden. Durch die entsprechenden Zentrifugationskräfte und Trägheit der Masse werden Belastungen auf Scaffolds erzeugt. Daneben existieren für *in vitro* Gewebekulturen Perfusionsreaktoren, oder hydrostatische Druckreaktoren mit und ohne Perfusion. Ein weiteres Konzept sind die mechanischen Kompressionsreaktoren, bei denen Kräfte mittels mechanischem Druck erzeugt werden, die auf die Gewebekonstrukte wirken. Der Druck kann dabei entweder elektrisch, pneumatisch oder hydraulisch zugeführt werden (Schulz and Bader, 2007).

Viele Forschungsarbeiten berichten von unterschiedlichen Bioreaktorsystemen, die zur mechanischen Kompression verwendet werden. Sah et al. stellten bereits zwei Systeme vor, eine statische und eine dynamische Kompressionskammer, in der 12 Knorpelkonstrukte gleichzeitig mit konstantem oder zeitweisem Druck belastet werden können (Sah et al., 1989). Dieses System umzubauen, um damit zyklische Druckbelastungen zu erreichen, war eine große Herausforderung und endete in einem so großen System, das es nicht mehr in einen Inkubator eingebaut werden kann. Ein anderes System, das FX-5000™ Compression System von Flexcell® International Cooperation (Hillsborough, NC USA) ist im Vergleich dazu kommerziell erhältlich und für Standard-Kultur-Well Platten passend. Die Stoffwechselaktivität von Knorpelzellpellets wurde unter unterschiedlich hohen Kompressionsbedingungen untersucht und es konnte ein Zusammenhang zwischen der Adenosintriphosphat-(ATP) Freisetzung und den extrazellulären Signalen von Chondrozyten in Abhängigkeit der mechanischen Belastung gezeigt werden (Graff et al., 2000). In weiteren Studien wurden auf in Agarose eingebettete Knorpelzellen Kompressionskräfte mit einer Apparatur von Zwick Testing Machines (Leominster, UK) erzeugt. Unter statischen Kulturbedingungen sowie unter geringen Belastungen (0,3 Hz) wurde die Glykosaminoglykansynthese gehemmt, während eine Belastung mit einer Frequenz von 1 Hz die Synthese stimulierte (Lee and Bader, 1997). Chowdhury et al. konnte unter Verwendung derselben Apparatur bei Häufungen von länger anhaltenden periodischen Belastungen eine erhöhte Proteoglykansynthese beobachten, während eine Steigerung der Zellproliferation eher bei kurzen periodischen Druckbelastungen zu beobachten war (Chowdhury et al., 2003).

Neben den kommerziell erhältlichen Systemen gibt es zahlreiche individuell angefertigte Bioreaktorsysteme für die dynamisch mechanische Druckbelastung von Chondrozyten-Scaffolds, dessen Aufbau und Wirkung ähnlich sind. So sind folgende Systeme alle einaxiale Drucksysteme, die in Standardinkubatorschränke passen: das Druckgerät von Hunter zur Kompression von

zellbeladenen Kollagen- oder Fibringelen (Hunter et al., 2002, 2004), die Apparatur von Elder, die Zellen aus Hühnerbeinen in Agarosegelen mit Druckkraft beansprucht (Elder et al., 2000, 2001), das Gerät von Huang zur Untersuchung der kombinatorischen Wirkung von Belastung und TGF- β auf die Chondrogenese von Hasen-MSZ in Agarosegelen (Huang et al., 2004), sowie das mechanische Belastungssystem für mit Chondrozyten besiedelten Agarose-Matrices (Mauck et al., 2000, 2002) und zweischichtige Komposit-Konstrukte (Hung et al., 2004). Darüber hinaus gibt es auch Entwicklungen biaxialer Systeme, bei denen große und kleine zyklische Scherkräfte sowie Druckkräfte auf die Knorpelimplantate in der *ex vivo* Gewebekultur ausgeübt werden. Ferner können bei diesen Systemen die biosynthetische Antwort der Chondrozyten auf dynamische Scherdeformation des Gewebes untersucht werden (Frank et al., 2000). Ein weiterer biaxialer Gewebebioreaktor, zur Kultivierung von Chondrozyten besiedelten Calciumpolyphosphat-Scaffolds in Standard 24-Well Platten, basiert auf einem modifizierten, kommerziell erhältlichen mechanischen Tester, dem Mach-1TM von Biosyntech (Quebec, C) (Waldman et al., 2003, 2004).

2.10 Ziel der Arbeit

Fragestellung: Im Rahmen dieser Arbeit soll ein vaskularisiertes 3D Meniskuskonstrukt mit Hilfe der Methode des Tissue Engineering aufgebaut werden, welches als Meniskusersatz eingesetzt werden kann.

Hypothese: Durch die Auswahl einer geeigneten 3D Matrix-Umgebung und der Kombination von mehreren Zelltypen soll ein komplexes und funktionelles Gewebekonstrukt entstehen.

Vorgehensweise: Im ersten Schritt werden primäre Zellen, mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEZ) sowie Meniskuszellen (MZ) aus Gewebebiopsaten isoliert und *in vitro* kultiviert. Den Zellen wird *in vitro* eine zelltypspezifische Matrixumgebung bereitgestellt, wobei für die mvEZ ein Stück eines Schweinedarms mit azellularisierten Gefäßstrukturen (BioVaSc[®]) und für die MZ eine geeignete Kollagenmatrix (Kollagen Typ I Hydrogel) dient. Es folgt der Aufbau eines Ko-Kultursystems aus den jeweils zellspezifisch besiedelten Biomaterialien und deren Kultivierung in einem dynamischen Bioreaktorsystem. Die Validierung und Charakterisierung des aufgebauten 3D Meniskuskonstrukts erfolgt mit Hilfe histologischer, immunhistologischer sowie proteinbiochemischer Analysen.

Weiter sollen 3D Knorpelkonstrukte mit primären mesenchymalen Stammzellen (MSZ) auf-

gebaut werden. Dafür erfolgt zunächst die Isolation und Charakterisierung von aus Spongiosa isolierten MSZ und die Auswahl einer geeigneten 3D Kollagenmatrix, die die chondrogene Differenzierung der MSZ auch ohne zugegebene Wachstumsfaktoren im Kulturmedium impliziert. Dazu erfolgt die Entwicklung einer fünfschichtigen elektrogewebten Matrix, die aus Kollagen Typ I und II besteht, die die chondrogene Differenzierung humaner MSZ beeinflusst. Schließlich folgt die Entwicklung eines spezifischen Bioreaktors, mit dem mechanische Kompressionskräfte auf das 3D Meniskuskonstrukt wirken sollen und dabei die chondrogene Differenzierung von MSZ während der *in vitro* Kultur beeinflusst werden könnte.

Kapitel 3

Material

In den folgenden Unterkapiteln sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten biologischen Biopsiematerialien, die eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien für Zellkultur, Histologie, Immunhistologie und Genexpressionanalyse, sowie benötigten Chemikalien und Geräte zusammengefasst.

3.1 Biologisches Material

3.1.1 Zellkultur

Für die biologischen Versuche wurden primäre mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEZ), mesenchymale Vorläuferzellen (MSZ) und Meniskuszellen (MZ) humanen sowie porcinen Ursprungs eingesetzt.

Gemäß der Begutachtung durch das Ethikvotum des Universitätsklinikums Würzburg bezüglich der Isolation der primären Zellen bestehen keine Bedenken (Zeichen 182/10). Die Zellisolation, der Aufbau von 2D und 3D Gewebekulturen und deren Analysen erfolgte unter Verwendung von standardisierten Arbeitsanweisungen (SOPs), die im folgenden Kapitel 4 dargestellt sind. Darunter sind bereits etablierte, modifizierte, sowie neu entwickelte Protokolle. In Tabelle 3.1 sind die Spenderdaten der isolierten Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sowie die spezifischen Kulturmedien zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Zellen und den Spenderdaten

Zelltyp	Alter	Geschlecht	Isolationsdatum	Kulturmedium
hMSZ1	77	männlich	07.04.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ2	56	männlich	28.04.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ3	55	männlich	07.06.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ4	70	weiblich	11.06.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ8	71	weiblich	06.10.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ9	67	männlich	06.10.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ10	75	weiblich	02.12.2010	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ12	78	männlich	18.01.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ13	79	männlich	17.02.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ14	68	weiblich	02.03.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ16	68	männlich	06.04.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ17	72	weiblich	17.05.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ18	63	männlich	22.06.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ22	N/A	männlich	15.09.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ26	N/A	weiblich	11.11.2011	MSCGM-CDr+2%FCS
hMSZ27	63	weiblich	16.03.2012	MSCGM-CDr+2%FCS
hmvEZ62	51	N/A	27.07.2011	VascuLife®
hmvEZ66	4	männlich	07.09.2011	VascuLife®
hmvEZ100	N/A	männlich	N/A	VascuLife®
hmvEZ101	29	männlich	09.10.2012	VascuLife®
hmvEZ102	44	männlich	N/A	VascuLife®
hmvEZ103	27	männlich	N/A	VascuLife®
pmvEZ1	N/A	N/A	10.08.12	VascuLife®
pmvEZ2	N/A	N/A	28.08.12	VascuLife®
hMeniskus 7	69	weiblich	04.08.2010	Positivkontrollgewebe
hMZ22	N/A	N/A	19.10.2011	DMEM+10%FCS
hMZ26	70	männlich	28.03.2012	DMEM+10%FCS
hMZ27	65	weiblich	29.03.2012	DMEM+10%FCS
hMZ28	81	weiblich	14.03.2012	DMEM+10%FCS
hMZ36	73	weiblich	31.08.2012	DMEM+10%FCS
hMZ37	N/A	N/A	21.09.2012	DMEM+10%FCS
pMZ1	N/A	N/A	02.02.2011	DMEM+10%FCS

3.1.2 Kollagenbasierte Biomaterialien

In diesem Unterkapitel werden die kollagenbasierten Biomaterialien, die kommerziell erhältlich sind, erläutert. In Vorversuchen, hMZ mit hmvEZ in einem System gemeinsam zu kultivieren, erfolgte die Verwendung der Collagen Cell Carrier (CCC) von Viscofan BioEngineering (Weinheim, D). Die CCC ist eine nicht quervernetzte Kollagen-Matrix vom Kollagen Typ I boviner Herkunft. Sie weist eine Dicke zwischen 15 und 25 μm auf und kann beidseitig mit Zellen *in vitro* besiedelt, sowie für den *in vivo* Einsatz genutzt werden.

Ein weiteres Scaffold, welches verwendet wurde, ist das Kollagen Composite Scaffold von BD Biosciences (Heidelberg, D). Das BD Scaffold ist ein natürliches Biomaterial, das aus einer Mischung von bovinem Kollagen Typ I und III besteht. Es weist eine fibrilläre Kollagenstruktur auf, die vergleichbar mit der interstitialen Kollagenmatrix ist. Der Durchmesser der Scaffolds beträgt zwischen 4,2 und 5,2 mm und die Höhe zwischen 3,9 und 4,5 mm. Die durchschnittliche Porengröße liegt zwischen 100 und 200 μm . Die Matrix liegt im gefriergetrockneten Zustand vor. Eine Zellbesiedelung *in vitro* ist sowohl im trockenen als auch im nassen Zustand möglich. Die Bio-Gide[®] Membran von Geistlich Pharma AG (Wolhusen, CH) ist eine resorbierbare zweischichtige Kollagenmembran porcinen Ursprungs, deren Testung ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Die zweischichtige Struktur der Membran, eine rauhe und eine weiche Seite, soll die Integration in dem später eingebrachten Defekt verbessern. Seit 1996 ist die Bio-Gide[®] Membran weltweit in der klinischen Anwendung und kann lyophilisiert bezogen werden.

Die dritte 3D kollagenbasierte Matrix, die auf Zellintegration untersucht wurde, stellt die Bio-Mesh Matrix von Bard Medical (Covington, USA) dar. Sie ist ein azelluläres Kollagenfließ aus Kollagen Typ I, das aus porciner Dermis und den darin enthaltenen Elastinfasern isoliert wird. Dieses natürliche Biomaterial ist bereits in der klinischen Anwendung und wird in der Beckenregeneration angewendet. Die Lieferung dieses Scaffolds erfolgte in einer Pufferlösung.

3.2 Materialien für die Genexpressionsanalyse

Es folgt die Auflistung der verwendeten Primer, Kits und für die Genexpressionsanalyse benötigter Chemikalien.

Tabelle 3.2: Primersequenzen zur Genexpressionsanalyse

Primersequenz [5'-3']	Produktgröße [bp]	T _A [°C]	Quelle
<u>Aggrekan</u> sense: CTCTTCTACGGGGACAGCAG antisense: GCCTTGAGCAGTTCACCTTC	392	54	(Heymer, 2008)
<u>Ef1α</u> sense: AGGTGATTATCCTGAACCATCC antisense: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC	235	54	(Heymer, 2008)
<u>Kollagen I</u> sense: GGACACAATGGATTGCAAGG antisense: TAACCACTGCTCCACTCTGG	461	51	(Heymer, 2008)
<u>Kollagen II</u> sense: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC antisense: CTTCAGCACCTGTCTCACCA	374	58	(Heymer, 2008)
<u>Kollagen X</u> sense: CCCTTTTTGCTGCTAGTATCC antisense: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC	468	54	(Heymer, 2008)
<u>MMP3</u> sense: CACTTCAGAACCTTTCCTGGCATC antisense: GCTTCAGTGTTGGCTGAGTG	388	51	(Heymer, 2008)

Tabelle 3.3: Materialien für RNA-Isolation, reverse Transkription und PCR

Substanz	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
dNTPs (100mM)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-27036
Magnesiumchlorid (50 mM)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-21083
Mango-Taq Puffer (5x)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-21083
Random Hexamere	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	BIO-27036
Reaction Buffer (5x)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-27036

Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-27036
RNeasy MicroKit	QIAGEN	Hilden (D)	74004
Taq-Polymerase (5000 U/ml)	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)	BIO-21083
100 bp DNA Ladder Plus	PEQLAB GmbH	Erlangen (D)	25-2020

Tabelle 3.4: Komponenten für den cDNA-Synthese MasterMix Ansatz

Komponente	Volumen pro Probenansatz [μ l]
5x Reaction Buffer	4
10 mM dNTP	1
ddH ₂ O	2,75
BioScript Reverse Transkriptase	0,25

Tabelle 3.5: Komponenten für PCR-Ansatz

Komponente	Volumen [μ l]	Konzentration
cDNA	1	
Forward-Primer	1	5 μ l
Reverse-Primer	1	5 μ l
MgCl ₂	1	50 mM
Mango-Taq Puffer	6	
ddH ₂ O	18,7	
Mango-Taq Polymerase	0,3	5 U/ml

3.3 Antikörper, Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie

Es folgt die Auflistung der verwendeten Antikörper, Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie.

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon	eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Isotypkontrolle	Hersteller	Firmensitz
Aggrekan	1R11 14A6	0,5	IgG1	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)
CD31	JC70A	0,035	IgG1	Dako	Hamburg (D)
Kollagen I	I-8H5	0,1	IgG2a	Acris	Herford (D)
Kollagen II	II-4C11	0,67	IgG1	Acris	Herford (D)
Kollagen X	COL-10	0,25	IgM	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze (D)
RunX2	-	10,0	IgG2a	Abcam	Cambridge (UK)
Sox9	-	0,33	IgG2a	Abcam	Cambridge (UK)
VEGF	-	10,0	Rb Serum	Abcam	Cambridge (UK)
vWF	F8/86	0,12	IgG1	Dako	Hamburg (D)

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie

Puffer/Lösungen	Komponenten	Konzentration
Eosinlösung (1%)	Eosin gelöst in ddH ₂ O	10.00 mg/ml
H ₂ O ₂ -Lösung (3%)	H ₂ O ₂ -Lösung (30%) gelöst in ddH ₂ O	10% (v/v)
TBS-Waschpuffer Stocklösung (0,5 M) pH 7,6	Trizma hydrochloride NaCl gelöst in ddH ₂ O	78,80 g/l 87,66 g/l
TBS-Waschpuffer Arbeitslösung (0,05 M) pH 7,6	TBS-Waschpuffer 0,5 M Tween 20 gelöst in ddH ₂ O	10% (v/v) 0,5% (v/v)

3.4 Medien für Zellkultur, Puffer und Lösungen

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur zusammengestellt.

Tabelle 3.8: Kultivierungsmedien für die Zellkultur

Medium	Komponenten	Konzentration	Hersteller	Firmensitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) pH 7,2	DMEM powder (high glucose, 4,5 g/l) NaHCO ₃ gelöst in ddH ₂ O	13,38 g/l 3,7 g/l	PAA Laboratories GmbH	Pasching (A)
DMEMr	DMEM FCS	 10% (v/v)	PAA Laboratories GmbH Lonza	Pasching (A) Köln (D)
MSCGM-CDr	MSCBM-CD MSCGM-CD FCS	500,00 ml 5,00 ml 2% (v/v)	Lonza	Köln (D)
VascuLife®	VEGF Complete Medium rh VEGF rh FGF-b rh IGF-1 rh EGF Ascorbinsäure Hydrocortison L-Glutamin Heparin FCS	500,00 ml 5,00 ng/ml 5,00 ng/ml 15,00 ng/ml 5,00 ng/ml 50,00 µg/ml 1,00 µg/ml 10,00 mM 0,75 U/ml 2% (v/v)	CellSystems GmbH	Troisdorf (D)

Tabelle 3.9: Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Puffer/Lösungen	Komponenten	Konzentration
Kollagenaselösung	Kollagenase 4 gelöst in DMEM	500 U/ml
GNL	DMEM medium (4fach konzentriert) HEPES Lösung (3M) Chondroitinsulfatlösung FCS	232,50 ml 7,50 ml 2,50 ml 7,50 ml
Dispaselösung	Dispase Pulver gelöst in PBS ⁻	2,00 U/ml
HEPES Lösung (3M) pH 7,8	HEPES Natriumhydroxid gelöst in ddH ₂ O	35,75 g 10,00 units
Kollagenaselösung	Kollagenase Pulver gelöst in DMEM	500 U/ml
MTT Reagenz	MTT gelöst in ddH ₂ O	3,00 mg/ml
Papainlösung	Papain L-Cystein Natriumacetat EDTA	0,56 U/ml 2,5 mM 35 mM 12,5 mM
PBS⁻ pH 7,2	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O gelöst in ddH ₂ O	140,00 mM 2,00 mM 1,50 mM 6,50 mM
PBS⁺ pH 7,2	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O MgCl ₂ × 6 H ₂ O CaCl ₂ gelöst in ddH ₂ O	140,00 mM 2,00 mM 1,50 mM 6,50 mM 0,50 mM 0,90 mM
PBS⁻/EDTA pH 7,2	EDTA gelöst in PBS ⁻	0,54 mM

Trypsin (1x)	Trypsin (10x) gelöst in PBS ⁻ /EDTA	10% (v/v)
--------------	---	-----------

3.5 Chemikalien

In der folgenden Tabelle sind die Chemikalien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden der Hersteller, der Firmensitz und die Bestellnummer zusammengefasst.

Tabelle 3.10: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz	Bestellnummer
2-Propanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	9866.6
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid	Serva	Heidelberg (D)	20395.01
Aceton (99,5%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	5025.5
AEC Chromogen	DCS Diagnostik-Systeme	Hamburg (D)	AC139R006
Agarose	AppliChem GmbH		A2114/CA50
Alcianblau	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	A3157-10G/DAL1100
Antikörperverdünnungslösung	DCS Diagnostik-Systeme	Hamburg (D)	AL120R500
Aquatex	VWR	Darmstadt (D)	1.08562.0050
Biocoll-Lösung (1,077 g/ml)	Biochrom AG	Berlin (D)	L6115
Brillant Crocein Säurefuchsin	Chroma	Münster (D)	1B-525
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	C4384-1G
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	D4902-100MG
Dialkylcarbocyanin Dil	Promocell GmbH	Heidelberg (D)	PK-CA 707-60010

Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Darmstadt (D)	1065801000
Dispase-Pulver	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	17105-041
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	D2438-50ML
Entellan	Merck KGaA	Darmstadt (D)	1.079.600.500
Eosin	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	861006-25G
Essigsäure (100%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	6755.1
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	9065.4
Ethanol (96%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	T171.2
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH	Darmstadt (D)	CE80
FCS	Lonza	Köln (D)	DE14-801F
Fluoromount-G TM	SouthernBiotech	Birmingham (USA)	SBA-0100-01
Gentamycin (10 mg/ml)	PAA	Cölbe (D)	P11-004
HEPES	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	H4034
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	3816.1
HMDI	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	52649-100ML
Hydrogenperoxidase (H_2O_2) (30%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	8070.2
ITS+1	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	I2521-5ML
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA	Darmstadt (D)	1049361000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	Darmstadt (D)	1048731000
Kalziumchlorid	VWR	Darmstadt (D)	1.02391.1000
Kernechtrot	Merck KGaA	Darmstadt (D)	1.15939.0025
Kollagenase NB4 (0,12 PZU/mg)	Serva	Heidelberg (D)	17454
Korsolex [®]	Bode Chemie	Hamburg (D)	8532038
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	A8960

LIVE/DEAD [®] Viability/Cytotoxicity Kit	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	L-3224
L-Prolin	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	P8865
Methanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	HN41.1
MTT	Serva	Heidelberg (D)	20395.03
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	P5280
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH	Darmstadt (D)	A3597
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	HN01.2
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH	Darmstadt (D)	CN35
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	6771.3
Na ₂ EDTA	AppliChem GmbH	Darmstadt (D)	A3350,1000
Paraffin Roti-Plast	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	6642.6
PBS ⁻ Tabletten	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	18912-014
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA	Cölbe (D)	P11-010
PFA (4%)	AppliChem GmbH	Darmstadt (D)	A3813,0500
Quantikine [®] Human Endostatin Immunoassay	R& D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt (D)	DNST0
Salzsäure (37%, 1M)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	4625.2
Saffron du Gatinais	???	???	???
TGF-β3	R& D Systems GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt (D)	100-B-010
Tissue Tek [®] O.C.T. Compound	Weckert	Kitzingen (D)	600001
Tris	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	4855.1
Trizma hydrochloride (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich GmbH	München (D)	T5941-1KG

Triton-X 100	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	3051.2
Trypanblau (0.4%)	Sigma-Aldrich GmbH	Karlsruhe (D)	T8154-100ML
Trypsin (10x)	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	18912-014
Tween 20	VWR	Darmstadt (D)	8.22184.0500
Trypsin (10x)	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	18912-014
ddH ₂ O	Millipore	Schwalbach (D)	-
VE H ₂ O	UKW-LTERM	Würzburg (D)	-
Versene (1:5, 1x)	Invitrogen GmbH	Darmstadt (D)	15040-033
Xylol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)	9713.3

3.6 Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien

Nachfolgend sind die verwendeten Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien in Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 3.11: In dieser Arbeit eingesetzte Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller	Firmensitz
Absaugereinrichtung Vacusafe	Integra Biosciences	Fernwald (D)
Abzug	Prutscher	Neudörfel (D)
Autoklav		
Tecnoclav	Biomedis	Giessen (D)
Tischautoklav	Systec	Wettenberg (D)
Varioklav	H+P	Hackermoos (D)
Becherglas aus Plastik/Glas	Schott-Glas	Mainz (D)
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific	Dreieich (D)
Blockstation	Leica	Wetzlar (D)
Dampfgarer	Braun	Kronberg/Taunus (D)
Doppelgelsystem PerfectBlue	Peqlab Biotechnologie	Erlangen (D)
Edelstahlgießformen	Labonord	(Mönchengladbach (D))
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific	Dreieich (D)
Einfrierbehälter	VWR	Darmstadt (D)
Eismaschine AF-80	Scotsman/HIBU	Sprockhövel (D)

Erlenmeyerkolben aus Glas	Schott-Glas	Mainz (D)
Gefrierschrank -20°C -80°C	Liebherr Kendro	Biberach a.d. Riss (D) München (D)
Glaspipetten- Reinigungsautomat	Hözel	Hörlkofen (D)
Glaswaren	Schott	Mainz (D)
Handzähler	neoLab	Heidelberg (D)
Heißluftsterilisator	Memmert Heraeus	Hanau (D)
Einhängethermostat für Was- serbad	Lauda	Lauda-Königshofen (D)
Klemmen	VMP GmbH	Ochtrup (D)
Kolbendichtung, 12.5x20x3.2	Sahlberg GmbH Co KG	Feldkirchen (D)
Kolbenführungsring, 20x5.6x2.5	Sahlberg GmbH Co KG	Feldkirchen (D)
Kritisch-Punkt-Trockner	BalTec	Uhingen (D)
Kühlplatte	Leica	Wetzlar (D)
Kurzzeitmesser	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)
Magnetischer Heizrührer	VWR	Darmstadt (D)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein	Würzburg (D)
Medibox Entsorgungsbehäl- ter	Braun	Melsungen (D)
Multimode-Mikroplatten Photometer Sunrise™	Tecan	Männedorf (CH)
Photometer Infinite® 200	Tecan	Männedorf (CH)
Mikropipetten	Eppendorf	Hamburg (D)
Mikroskop Axiovert 40 C Axio Observer.D1	Zeiss Zeiss	Göttingen (D) Göttingen (D)
Mikrowelle	Panasonic	Wiesbaden (D)
Multistep-Pipette	Brand	Wertheim (D)
Multistep-Pipette	Eppendorf	Hamburg (D)
NanoDrop-Platte	Tecan	Crailsheim (D)
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein	Würzburg (D)
pH-Meter	Mettler Toledo	Giessen (D)

Pinzetten	Assistent	Sondheim (D)
Pipettenstopfmaschine	BellCo Glass Dunn	Asbach (D)
Pipettierhilfe	Brand	Wertheim (D)
Power Supply Model D-ES50PN-10W	Gamma High Voltage	Ormond Beach, FL (USA)
Pumpschlauch ID 0,25mm Pharmed Ismaprene	Ismatec	Glattbrugg (CH)
Rasterelektronenmikroskop DSM940	Zeiss	Oberkochen (D)
Rillenkugellager FAG, S6000-HLC	Lamb	Würzburg (D)
Schlittenmikrotom	Leica	Wetzlar (D)
Schlauchpumpe	Ismatec	Wertheim (D)
Schlauchverbinder Kunststoff	Ismatec	Wertheim (D)
Schüttelbad	neoLab	Heidelberg (D)
Seeger-Sprengringe SB für Bohrungen, Nennmaß 22	Lamb	Würzburg (D)
Septophag	Hesse	Emmerich (D)
Silikonschlauch ID 3,2 mm	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)
Skalpellschalenhalter	Bayha	Tuttlingen (D)
Spiegelreflexkamera EOS 1000D	Canon	Krefeld (D)
Spritzenpumpe	HLL GmbH	Langenhagen (D)
Sputtergerät Emitech K550	Quorum Technologies LTd	East Grinstead (UK)
Spülmaschinen	Miele	Gütersloh (D)
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich (D)
Thermocycler	SensoQuest	Göttingen (D)
Trockenschrank	Memmert Heraeus	Hanau (D)
Vortexer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)
Waage		
Analysenwaage	Kern	Balingen-Frommern (D)
Präzisionswaage	Kern	Balingen-Frommern (D)
Wärmeplatte	Medax	Kiel (D)
Wärmeschrank	Medite	Burgdorf (D)

Wasserbad	Lauda	Lauda-Königshofen (D)
Wasserbad für Paraffinschnitte	Medax	Kiel (D)
Wellendichtring FKM 80, 10x22x6	Lamb	Würzburg (D)
Wippschüttler	neoLab	Heidelberg (D)
Zentrifuge Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg (D)
Zentrifuge 5424C	Eppendorf	Hamburg (D)
Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich (D)

Tabelle 3.12: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Firmensitz
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH	Karlsruhe (D)
Chamberslides Permanox/-Glas	Nunc	Wiesbaden (D)
Combitips Eppendorf	Eppendorf	Hamburg (D)
Deckgläser 24x60 mm	Menzel-Gläser	Braunschweig (D)
Einbettfilterpapier	Labonord	Mönchengladbach (D)
Einbettkassetten mit Deckel	Klinipath	Duiven (NL)
Einmalpipetten aus Polystyrol	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
Filterpapier, gefaltet	Albet LabScience	Dassel (D)
Filterpipettenspitzen	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
Handschuhe Nitril	Kimberly-Clark	Koblenz Rheinhafen (D)
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc	Wiesbaden (D)
Mikrotiterplatte 6/12/24/96 Well, transparent	TPP	Trasadingen (D)
Mikrotom Einmalklingen, Typ A35	pfm medical	Köln (D)
Objektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney	Düsseldorf (D)

Pasteurpipetten aus Glas	Brand	Wertheim (D)
PCR-Stripes (Polypropylen)	Brand	Wertheim (D)
Petrischalen, unbeschichtet	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
PET Inserts	Merck Millipore	Schwalbach (D)
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf	Hamburg (D)
QIAshredder	QIAGEN	Hilden (D)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf	Hamburg (D)
Septophag-Ersatzbeutel	Porod	Frauenhofen (D)
Sterilfilter	Sartolon Stedium Biotech	Göttingen (D)
Sterilisierverpackung	Melag	Berlin (D)
Skalpellklingen	Bayha	Tuttlingen (D)
Vernichtungsbeutel PP	Hartenstein	Würzburg (D)
Zellkulturflaschen (T25, T75, T150)	TPP	Trasadingen (D)
Zellsieb, Nylon (100 µm)	BD Biosciences	Heidelberg (D)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)

Kapitel 4

Methoden

Im Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin wird auch im Forschungs- und Entwicklungsbereich mit einem standardisierten Arbeitsanweisungs-System (SOP-System) gearbeitet. Aus diesem Grund sind die standardisierten Methoden (bereits etablierte, modifizierte und neu entwickelte Methodenprotokolle) in Form der gültigen SOP dokumentiert. Lediglich neue Methoden werden ausformuliert.

4.1 Steriler Arbeitsplatz

1. Materialien

- Papiertücher

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Absaugeinrichtung
- Wasserbad

3. Lösungen

- 70% EtOH zur Desinfektion (Sprühflasche)

4. Durchführung

- Werkbank einschalten
- mind. 15 min laufen lassen
- mit EtOH aussprühen und mit Papiertüchern trocken wischen

- aktuell benötigte Materialien und Geräte können eingebracht werden
 - nach Beendigung der Sterilarbeiten:
benutzte Geräte und Materialien aus der Werkbank nehmen, in die Desinfektionsbäder bzw. zum Spülen geben, Arbeitsfläche bei starker Verschmutzung zuerst mit Wasser und/oder Reinigungsmittel und danach mit 70%igem EtOH erneut desinfizieren
 - nach Abschluss der Arbeiten sicherstellen, ob anschließend an der Bank gearbeitet werden soll
- Abschluss:
- alle nicht ständig benötigten Materialien und Geräte ausräumen (nur ein Pipetboy, 1 Satz Eppendorfpipetten, Pipettenspitzen, Falcon-Ständer und Medibox sollten in der Bank verbleiben)
 - Absaugeinrichtung: wenige ml Sprühalkohol ansaugen bis Schlauch gespült, Arbeitsfläche gründlich mit Sprühalkohol desinfizieren
 - Werkbank ausschalten
 - Wasserbad: mind. 1x wöchentlich Wasser wechseln, Wanne reinigen, mit Sprühalkohol auswischen, nur mit VE-Wasser wieder befüllen
 - Arbeitsplatz sauber und ordentlich verlassen

5. Bemerkungen

- Um optimale Strömungsverhältnisse in der Sicherheitswerkbank zu gewährleisten, sollten sich dort nur wenige, aktuell benötigte Materialien und Geräte befinden.
- Die Luftschlitze um den Arbeitsbereich dürfen auf keinen Fall belegt werden.
- regelmäßige Reinigung der Werkbank nach Geräteanleitung; zusätzliche Reinigung nach Verschmutzung, z.B. durch Verschütten von Medium bzw. Gefahrstoffen, v.a. wenn Verschmutzungen (durch die Luftschlitze) in den Bereich unterhalb der Arbeitsfläche gelangen

4.2 Zellisolation und Kultivierung der Zellen

4.2.1 Isolation humaner mesenchymaler Vorläuferzellen aus Spongiosa

1. Materialien

- sterile Pasteurpipetten

- sterile Glaspipetten
- T150 Zellkulturflaschen
- 50 ml-Zentrifugenröhrchen
- sterile Pinzette
- 10 ml-Einmalpipetten
- Zellzählkammer

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad (37°C)
- Zentrifuge
- Mikroskop

3. Lösungen

- MSZ-Kulturmedium:
MSCGM-CD + 2% FCS + 1% Antibiotikum
- 1x Lysis Puffer
- PBS⁺
- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung

Isolation:

- Spongiosa in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit steriler Pinzette überführen (max. halb füllen)
- vorgewärmtes PBS⁺ zugeben (ca. 20 ml pro Durchgang zugeben)
- kräftig schütteln, um die Zellen aus der Spongiosa herauszuwaschen
- Überstand mit Einmalpipette aufnehmen und in ein neues Röhrchen überführen
- so lange wiederholen, bis die Spongiosa fast weiß ist
- gesammelte Zellsuspension für 5 min bei 300 xg zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Zellen in ausreichend Medium gut resuspendieren (ca. 25 ml)
- Probe zum Zählen entnehmen (50 µl) und mit 1x Lysis Puffer 1:1 mischen
- Anschließend das Zell-Lysis Puffer Gemisch 1:1 mit Trypanblau mischen (Endkonzentration 1:4)

- Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchführen
- $5 \cdot 10^5$ Zellen/T150-Zellkulturflasche aussäen

Kultivierung:

- nach ca. 3-4 Tagen Überstand (mit Blutzellen) entfernen, adhärente Zellen mit PBS⁺ waschen
- Zugabe von 20 ml Kulturmedium
- Medienwechsel 2x pro Woche

5. Bemerkungen

- Alter und Geschlecht des Spenders sowie Tag der Aufarbeitung und Name des Durchführenden in der Biopsientabelle vermerken
- Bei einer „guten“ MSZ-Kultur ist die Konfluenz der Primärkultur nach ca. 10-14 Tagen zu erwarten.

weitere Kultivierung:

Bei einer Aussaat von $4 \cdot 10^5$ Zellen pro T150-Zellkulturflasche in den weiteren Passagen ist nach ca. 7 Tagen mit Konfluenz zu rechnen. Bis Passage 5 verwendbar.

4.2.2 Isolation porciner mesenchymaler Vorläuferzellen aus Knochenmarksaspirat

1. Materialien

- sterile Pasteurpipetten
- sterile Glaspipetten
- T75 Zellkulturflaschen
- sterile Zentrifugenröhrchen 50 ml
- 5 ml-Einmalpipetten

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad (37°C)
- Zentrifuge

3. Lösungen

- MSCGM-CD + 2% FCS
- Biocoll-Lösung, Dichte 1,077 g/ml, isotonisch
- PBS⁻-Puffer
- PBS⁻/EDTA-Pufferlösung

4. Durchführung

Isolation:

- Sterilbank anschalten
- Knochenmarksaspirat 1:1 mit Medium oder PBS⁻-Puffer verdünnen
- In 50 ml Zentrifugenröhrchen je 15 ml Biocoll vorlegen und vorsichtig mit 20 ml verdünntem Aspirat überschichten
- Gradientenzentrifugation: 800 xg/20 min/RT/ohne Bremse
- Mittlere milchige Phase mit mononucleären Zellen vorsichtig mit 5 ml Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen (zur Hilfe kann der Überstand vorher abgesaugt werden)
- Mit 35 ml Medium oder PBS⁻/EDTA-Puffer mischen (herauswaschen der Biocoll-Lösung)
- Zentrifugieren: 800 xg/10 min/RT/mit Bremse
- Diesen Waschschrift wiederholen (Überstand jeweils verwerfen)
- Pellet mit 10 ml Medium resuspendieren
- Suspension in eine T75 Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank 3-4 Tage inkubieren

Kultivierung:

- Medium absaugen, 1x mit 10 ml PBS⁻-Puffer spülen: dazu die Zellkulturflasche vorsichtig (!) leicht schwenken, um die restlichen Erythrozyten zu entfernen
- Weitere Medienwechsel 2x pro Woche

4.2.3 Isolation von primären mikrovaskulären Endothelzellen aus der Haut

1. Materialien

- Skalpellhalter mit sterilen Skalpellklingen
- Petrischalen
- sterile Pinzetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellsieb 100 µm
- 50 ml-Zentrifugenröhrchen

- Zellkulturflaschen
- sterile Glaspipetten
- sterile Einmalpipetten

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂) - Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad 37°C
- Zentrifuge
- Mikroskop
- Neubauer-Kammer

3. Lösungen

- Transportlösung für Biopsat: PBS⁺ mit 1% Gentamycin
- Dispase-Lösung (2,0 U/ml für humane Haut, 4,0 U/ml für porcine Haut)
- 0,05% Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung
- PBS⁺-Lösung
- PBS⁻-Lösung zum Spülen vor dem Dispase-Verdau
- Versene
- VascuLife[®]
- FCS
- Antibiotikum

4. Durchführung

Isolation:

- für Sterilkontrolle: 3 ml Transportmedium in T25-Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank ü.N. inkubieren
- Hautbiopsat in sterile Petrischale überführen und mit Skalpell aufschneiden
- 3x mit PBS⁺-Lösung spülen und etwas PBS⁺-Lösung in Petrischale belassen, damit Gewebestücke nicht „trocken fallen“
- sorgfältig Fett- und andere Gewebereste entfernen
- 3x mit PBS⁺-Lösung spülen
- Größe (Fläche) des Hautstücks bestimmen (Bedarf Trypsin/EDTA-Lösung am nächsten Tag)
- Hautbiopsat mit Skalpell in ca. 2-3 mm breite Streifen schneiden (geringere ‚Kontamination‘ der Zellkultur mit Fibroblasten)

- Hautstücke in Petrischale überführen, 3x mit PBS⁻-Lösung waschen und danach mit Dispase-Lösung bedecken (5-10 ml auf 6 cm², alle Stücke müssen bedeckt sein, Angriffsfläche für die Dispase bieten!), bei 4°C (Kühlschrank) ü.N. (16-18 h) inkubieren

Weiterverarbeitung am nächsten Tag (= nach 16-18 h)

- Sterilkontrolle auf mögliche Kontamination überprüfen!

- 2 Petrischalen mit PBS⁺-Lösung vorbereiten: je eine für Dermis und Epidermis

- Dispase-Lösung aus der Petrischale absaugen und 10 ml PBS⁺-Lösung zugeben

- mit einer Pinzette das Hautstück festhalten, mit der zweiten Pinzette die Epidermis von der Dermis trennen und in die vorbereiteten Petrischalen überführen

- Epidermis ggf. weiter zur Gewinnung von Keratinozyten verwenden, andernfalls verwerfen

- Dermisstücke 1x mit 10 ml Versene/6 cm² spülen, Lösung wieder absaugen

- 10 ml pro 6 cm² Trypsin/EDTA-Lösung zu Dermisstückchen zugeben, 40 min im Brutschrank inkubieren

- die Enzymreaktion anschließend sofort mit 1% FCS abstoppen

- die Stückchen in eine Petrischale mit vorgewärmten VascuLife[®] überführen

- nun jedes Stückchen mit dem Skalpell unter leichten Druck 8x von allen Seiten austreichen

- Dermis ggf. weiter zur Gewinnung von Fibroblasten verwenden, andernfalls verwerfen

- Die entstandene Zell-Medium-Suspension über das Zellsieb in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen (Gewebereste werden zurückgehalten)

- Zellsieb 3x mit 5 ml VascuLife[®] nachspülen

- 5 min zentrifugieren bei 1200 U/min

- Überstand verwerfen (absaugen)

- Pellet mit 1-2 ml VascuLife[®] resuspendieren (je nach Pelletgröße)

- Zellzählung mit Neubauer-Kammer und/oder Zellzählgerät

Aussaatdichte für mvEZ aus Präputium:

- 1,2*10⁴ vitale Zellen pro cm² aussäen (T25-Flasche: 3*10⁵, in 3 ml Medium)

Aussaatdichte für mvEZ aus adulter Haut:

- 4-5*10⁴ vitale Zellen pro cm² aussäen (T25-Flasche: 1*10⁶, T75-Flasche: 3*10⁶)

- 1% Antibiotikum zugeben.

Kultivierung:

- alle 3-4 Tage Mediumwechsel

- dabei die Fibroblasten mit Versene aus den Kulturen entfernen: Inkubation 6-15 min

Dabei beachten: Die mvEZ lösen sich nach einer gewissen – von Patient zu Patient unterschiedlichen – Zeit ebenfalls ab (Ablösen der Fibroblasten unter dem Mikroskop beobachten).

- Danach 1x mit 5-10 ml PBS⁺ waschen und frisches Medium zugeben

- Es soll(t)en nur mvEZ-Kulturen verwendet werden, bei denen der Anteil an Fibroblasten < 10% liegt

- mvEZ sollten, wenn möglich, sofort nach der Primärkultur für Versuche eingesetzt werden.
- Werden höhere Zellzahlen benötigt, maximal bis Passage 3 (Aussaat bei Subkultivierung: $5 \cdot 10^3$ Zellen/cm²) für die Versuche verwenden.

5. Bemerkungen

Präputium:

- Alter des Spenders i.d.R. 0-8 Jahre
- Alter des Spenders im Protokoll bzw. im Laborbuch vermerken
- Aufbewahrungszeit max. 4 Tage nach OP bei 4°C
- Alle Spenderdaten sowie die ermittelten Zellzahlen in die Biopsatentabelle eintragen
- Adulte Hautbiopsate sollten spätestens 48h nach der OP aufgearbeitet werden, um eine optimale Ausbeute an Zellen zu erreichen.
- Primäre Endothelzellen wachsen im VascuLife[®] Medium deutlich besser und es wachsen deutlich weniger Fibroblasten hoch. Sollten Ko-Kulturen von mvEC und Fibroblasten aufgebaut werden, muss dies beachtet werden.

Verarbeitung des Gewebes:

- Wiederholtes Spülen des Gewebes ist sehr wichtig, um anheftende Keime zu entfernen! Die Gewebesuspension (nach Verdau) sollte mit Einmalpipetten resuspendiert werden, weil Glaspipetten bei diesem Verarbeitungsschritt stark verschmutzt werden, was entsprechende Reinigungsmaßnahmen erfordert.

4.2.4 Isolation primärer Meniskuszellen

1. Materialien

- Skalpellhalter mit sterilen Skalpellklingen
- Petrischalen
- sterile Pinzetten
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Zentrifugenröhrchen 50 ml
- sterile Zellsiebe Maschenweite 100 µm
- T75 Zellkulturflaschen
- sterile Glaspipetten
- Einmalpipetten 5 ml, 10 ml
- Zellzählkammer

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Absaugeinrichtung
- Pipettierhilfe
- Wasserbad (37°C)
- Zentrifuge
- Mikroskop

3. Lösungen

- Transport-/Aufbewahrungslösung für Meniskus: DMEM mit 1% Gentamycin
- MC-Kulturmedium: DMEM + 10% FCS + 1% Gentamycin
- PBS⁻
- sterile Kollagenase-Lösung (500 U/ml)

4. Durchführung

Isolation:

- Sterilbank anschalten
- Für Sterilkontrolle: 4 ml Transportmedium in kleine Zellkulturflasche → Brutschrank 37°C
- Meniskusgewebe in sterile Petrischale (15 cm) überführen
- sorgfältig Fett und andere Gewebereste entfernen
- 1x mit PBS⁻-Lösung spülen
- Gewicht des Meniskusstücks bestimmen (→ Bedarf an Kollagenase-Lösung für den Verdau)
- ein weiteres Mal mit PBS⁻-Lösung spülen und etwas PBS⁻-Lösung in Petrischale belassen, damit Gewebestücke nicht „trocken fallen“
- Biopsat mit Skalpell in kleine Stücke zerteilen
- Meniskusstücke in Zentrifugenröhrchen überführen, mit Kollagenase-Lösung bedecken (5 ml auf 1,5 g Meniskus)
- Bei 37 °C ü.N. im Schüttelwasserbad inkubieren
- zentrifugieren bei 1200 rpm, 5 min
- Überstand absaugen
- Stücke mit ausreichend Medium waschen
- zentrifugieren bei 1200 rpm, 5 min
- „Pellet“ in 2 ml Medium aufnehmen und in T75 Flasche aussäen

Kultivierung:

- Am nächsten Tag 6 ml Medium zu den Stücken dazugeben
- Medienwechsel 2x pro Woche

5. Bemerkungen

- Alter und Geschlecht des Spenders sowie Tag der Aufarbeitung und Name des Durchführenden in der Biopsatentabelle vermerken

- Bei einer „guten“ MC-Kultur ist die Konfluenz der Primärkultur nach ca. 10-14 Tagen zu erwarten.

Weitere Kultivierung:

Bei einer Aussaat von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro T150-Zellkulturflasche in den weiteren Passagen ist nach ca. 14 Tagen mit Konfluenz zu rechnen.

4.2.5 Passagieren von Zellen

1. Materialien

- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellkulturflaschen
- Zentrifugenröhrchen
- Zellzählkammer

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Wasserbad (37°C)
- Pipettierhilfe
- Absaugeinrichtung
- Zentrifuge
- Zellzählgerät
- Mikroskop

3. Lösungen

- Waschpuffer: PBS⁻/EDTA-Lösung
- Ablösepuffer: Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (0,05% in PBS⁻/EDTA)
- zellspezifisches Kulturmedium, ggf. mit Supplementen, Antibiotikum
- FCS
- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung

Generell gilt:

Alle Zellen, die sich leicht von der Kulturoberfläche ablösen lassen (z.B. viele Zelllinien, Fibroblasten), können ohne vorherige Inkubation in PBS⁻/EDTA-Lösung direkt mit Trypsin abgelöst werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Einwirkzeit des Enzyms 3 min nicht überschreitet.

- Schwer abzulösende Zellen, wie z.B. Keratinozyten, müssen mit PBS⁻/EDTA-Lösung mindestens 10 min vorinkubiert werden. Dabei ist der Ablösevorgang der Zellen immer wieder unter dem Mikroskop zu beobachten. Diese Zellen müssen vor Zugabe des Trypsins schon teilweise abgekugelt sein, wenn nicht, ist die Inkubation in PBS⁻/EDTA-Lösung zu wiederholen. Einwirkzeiten von Trypsin über 5 min sind unbedingt zu vermeiden, da dann eine Zellschädigung nicht mehr ausgeschlossen werden kann!

- mikroskopische Kontrolle der Zellkultur nach typischen Kriterien (z.B. Morphologie, Zelldichte, Kontaminationen)

- benötigte Wasch- und Ablöse-Puffer sowie Medium im Wasserbad temperieren (37°C)

- neue Zellkulturflasche(n) beschriften: Zellart, Passagenzahl, Datum, Namenskürzel - Werkbank vorbereiten

- Wasch- und Ablöse-Puffer aus dem Wasserbad nehmen

- Medium absaugen, Waschpuffer zugeben (T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml), spülen und absaugen

- optional: Waschpuffer zugeben (T25: 2 ml, T75: 5 ml, T150: 9 ml) und im Brutschrank für 10 min inkubieren

- Vorgang ggf. wiederholen (wenn Zellen noch nicht abgekugelt)

- Ablösepuffer zugeben (T25: 2 ml, T75: 5 ml, T150: 9 ml), max. 3-5 min im Brutschrank inkubieren, Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren, ggf. durch vorsichtiges Klopfen unterstützen.

- FCS aus Wasserbad entnehmen und in die Werkbank stellen, nach dem Öffnen Deckel mit Öffnung nach unten ablegen

- Enzymreaktion durch Zugabe von 1 ml FCS stoppen

- Zellen durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren, in Zentrifugenröhrchen überführen

- Zellkulturflasche jetzt noch einmal mit PBS⁻/EDTA spülen (T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml) und in das Zentrifugenröhrchen überführen

- Zellsuspension zentrifugieren: 1200 rpm, 5 min

- Überstand vorsichtig absaugen, Pellet in Medium resuspendieren

- davon Aliquot (mind. 10 µl, max. 50 µl) zur Zellzählung abnehmen)

- Zellzählung durchführen

- Medium in neuen Zellkulturflaschen vorlegen

- Zellen in gewünschter Konzentration in neue Zellkulturflaschen aussäen (Gesamtvolumina: T25: 2-3 ml, T75: 6-9 ml, T150: 18-20 ml)

5. Bemerkungen

- Deckel und Flaschenrand sauber und trocken halten, besonders nach der Temperierung im Wasserbad (um Kontaminationen zu vermeiden!)
- Zu Passagenzahl: beim Passagieren von Zellen wird immer eine Passage dazu addiert.

4.2.6 Zählung und Vitalitätsbestimmung

1. Materialien

- Pipettenspitzen
- Probengefäß
- Neubauerzählkammer mit Deckgläschen

2. Geräte

- Mikroskop
- Eppendorfpipette

3. Lösungen

- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung

- Aliquot (mind. 10 μ l, max. 50 μ l) der Zellsuspension in ein Probengefäß überführen
- 1:2 mit Trypanblau-Lösung (10-50 μ l) mischen und gut resuspendieren
- 2-5 min inkubieren
- Deckgläschen luftblasenfrei auf Neubauer-Zählkammer fixieren
- 10 μ l Probengemisch in die Zählkammer geben
- Auszählen von 4 Großquadraten unter dem Mikroskop: lebende Zellen sind weiß und tote blau

$$ZZ_{vital} = MW_{vital} * 10^4 * V_{FTB} * V_{Susp.ges.} \quad (4.1)$$

$$ZZ_{gesamt} = (MW_{vital} + MW_{avital}) * 10^4 * VF_{TB} * V_{Susp.ges.} \quad (4.2)$$

$$V_Z[\%] = \frac{ZZ_{vital}}{ZZ_{gesamt}} * 100\% \quad (4.3)$$

ZZ_{vital} : Anzahl der vitalen Zellen der Probe

ZZ_{gesamt} : Anzahl der gesamten Zellen der Probe

MW_{vital} : Mittelwert der aus den vier Quadranten ermittelten Anzahl an vitalen Zellen

MW_{avital} : Mittelwert der aus den vier Quadranten ermittelten Anzahl an avitalen Zellen

$V_{Susp.ges.}$: Gesamtvolumen der Zellsuspension

V_Z : Zellvitalität der Probe

VF_{TB} : Verdünnungsfaktor

5. Bemerkungen

- Trypanblau ist giftig, deshalb mit Handschuhen arbeiten!
- Zügig arbeiten, denn Zellen sterben nach längerem Kontakt (über 5 min) mit der giftigen Trypanblau-Lösung
- Zellen, die sich genau auf den Begrenzungslinien der Quadrate befinden, dürfen nicht zweimal gezählt werden. Deshalb zwei Ränder festlegen (z.B. rechts und unten), wo Zellen mitgezählt werden, die auf diesen Linien liegen. Dafür werden die, die (hier: links und oben) auf den Linien liegen, nicht mitgezählt.

4.2.7 Markierung der Zellen mit Dil

Für die Veranschaulichung der Zellmigration in Biomaterialien werden die MSZ vor der Besiedelung mit einem Fluoreszenzfarbstoff Dialkylcarbocyanin Dil markiert. Dil ist ein lipidlöslicher Farbstoff und wird unabhängig von Transportmechanismen in die Zellmembran eingelagert. Bei Zellteilung wird er auf die Tochterzellen übertragen, was jedoch zu einem geringen Verlust der Fluoreszenzintensität führt. Die Färbung ist lange anhaltend und nicht zytotoxisch, was sie für Untersuchungen wie Zellwachstum und Zellbewegung an Langzeitkulturen qualifiziert.

1. Materialien

- 50 ml-Zentrifugenröhrchen

- sterile Glaspipetten
- sterile Pipettenspitzen
- sterile Pasteurpipetten
- Nitrilhandschuhe

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Eppendorf-Pipetten
- Neubauerzählkammer und Deckglas
- Zentrifuge
- Brutschrank 37°C, 5% CO₂
- Wasserbad (37°C)
- Fluoreszenz-Mikroskop

3. Lösungen

Herstellung der Lösungen:

Dil PromoKine: 50 mg in 54 ml 100% EtOH auflösen

- serumfreies Medium (zellspezifisch)
- (spezifisches) Zellkulturmedium

4. Durchführung

- Zellen ablösen
- Zellpellet in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$
- Zugabe von 5 µl Farbstoff pro ml Zellsuspension
- Inkubation der Zellsuspension im Brutschrank für 20 Minuten bei 37°C, 5% CO₂
- Zentrifugation der Zellen für 5 min, 1200 rpm
- Zellen 2x mit Zellkulturmedium (37°C) waschen: Volumen mind. 10 ml, 5 min, 1200 rpm
- Resuspendieren der Zellen in gewünschter Aussaatdichte mit 37°C warmem Zellkulturmedium
- Aussaat der Zellen

Überprüfen der Färbung:

Unter dem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechendem Filterset

Dil (orange): Anregung = 549 nm, Emission = 565 nm

5. Bemerkungen

- Fluoreszenzfarbstoffe sind lichtempfindlich → Licht unter der Sicherheitswerkbank während dieser Arbeiten ausschalten

- Die Proliferation der Zellen äußert sich in der Abnahme der Fluoreszenzintensität. Bei jeder Zellteilung wird die Fluoreszenzintensität halbiert.

4.3 Differenzierung humaner und porciner Vorläuferzellen

Zur Charakterisierung der isolierten MSZ erfolgte die Differenzierung der Zellen in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten mit Hilfe von spezifischen Differenzierungsmedien.

1. Materialien

- sterile Glaspipetten
- sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml
- sterile Reaktionsgefäße
- 4-Well Chamberslides Permanox
- 24-Well Platte

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Pipettierhilfe
- Absaugeinrichtung
- Zentrifuge
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Wasserbad (37°C)

3. Lösungen

- Differenzierungszusätze:
 - o 50 mg/ml Ascorbat-2-Phosphat-Lösung
 - o 1 mM Dexamethason (1:10-Verdünnung mit 100% EtOH von der 10 mM Stammlösung)
 - o 1 M β -Glycerophosphat
 - o 500 mM IBMX
 - o 100 mM Indomethacin
 - o 100 mg/ml Pyruvate
 - o 40 mg/ml L-Proline
 - o 10 mg/ml Insulin

- o ITS
- o 10 µg/ml TGF-β3
- DMEM High Glucose (4,5 g/l)
- FCS
- hMSZ-Kulturmedium: MSCGM-CD + 2% FCS

Differenzierungsmedien werden stets in solcher Menge angesetzt, dass sie in möglichst einer Woche aufgebraucht werden können!

Medium für adipogene Differenzierung:

Komponenten	Endkonzentration
DMEM + 10% FCS	
Dexamethason	1 µM
IBMX	500µM
Insulin	1µg/ml
Indomethacin	100 µM

Medium für osteogene Differenzierung:

Komponenten	Endkonzentration
DMEM + 10% FCS	
Ascorbat-2-Phosphat	µg/ml
β-Glycerophosphat	10 mM
Dexamethason	100 nM

Medium für chondrogene Differenzierung:

Komponenten	Endkonzentration
DMEM	
Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml
Pyruvate	100 µg/ml
L-Proline	40 µg/ml
ITS+1	1%
Dexamethason	100 nM
TGF-β3	10 ng/ml

4. Durchführung

- Sterilbank anschalten

- Mesenchymale Vorläuferzellen (MSZ) ablösen und zählen

Adipogene bzw. osteogene Differenzierung in 4-Well Chamberslides Permax:

- pro Ansatz werden 2 Differenzierungsansätze (Diff.) und 2 Negativkontrollen (NK) kultiviert
- pro Kammer werden 100.000 Zellen ausgesät und zunächst jede Kammer mit 900 µl Stammzellmedium aufgefüllt und bis zum Erreichen einer 70%igen Konfluenz kultiviert.

- Beachten: Für die Negativkontrolle wird weiterhin das Stammzellmedium verwendet und für den Differenzierungsansatz das entsprechende (osteogene bzw. adipogene) Differenzierungsmedium.

- für die adipogene Differenzierung werden die MSZs 14 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert

- für die osteogene Differenzierung werden die MSZs 28 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert

- der Medienwechsel muss 3x pro Woche (Mo, Mi, Fr) durchgeführt werden.

Chondrogene Differenzierung in Pelletkultur:

- die chondrogene Differenzierung wird in einer 24-Well Platte durchgeführt

- es werden mindestens ein Differenzierungsansatz sowie eine Negativkontrolle benötigt

- 250.000 Zellen pro Ansatz in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugieren

- über Nacht inkubieren im Brutschrank

- Beachten: Für die Negativkontrolle wird das chondrogene Differenzierungsmedium ohne TGF-β3 verwendet und für den Differenzierungsansatz das chondrogene Differenzierungsmedium mit TGF-β3.

- TGF-β3 wird vor jedem Mediumwechsel frisch zum Medium zugegeben (1 µl TGF-β3/2ml chondrogenes Medium)! Dabei immer für alle Differenzierungsansätze Medium gesamt ansetzen (siehe Anmerkungen)

- für die chondrogene Differenzierung werden die Pellets 21 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert

- der Medienwechsel sollte 2x pro Woche (Mo, Fr) durchgeführt werden.

- es folgt die Einbettung der Zellpellets in Paraffin und zur Analyse histologische sowie immunhistologische Färbungen der Schnitte.

5. Bemerkungen

- Wird nicht alles TGF-β3 aus einem Aliquot benötigt, dann NICHT wieder einfrieren, sondern bis zum nächsten Medienwechsel im Kühlschrank (4°C) lagern.

- Bei der chondrogenen Differenzierung wird von Beginn an das Differenzierungsmedium (nicht das Stammzellmedium) verwendet.

4.4 Kollagenisolation

4.4.1 Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen

Das Kollagen Typ I dient als Rohmaterial zur Herstellung von Kollagen-Typ-I-Hydrogelen und elektrogenesponnenen Matrices.

1. Materialien

- Rattenschwänze (8-10 Wochen alt/Geschlecht unspezifisch)
- Skalpellhalter mit Skalpellklingen
- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml
- Hackenpinzette
- Sterile Petrischalen 14 cm
- Klemmscheren
- 250 ml Glasflasche
- sterile Spinnerflask
- sterile Metallwanne
- 1 l-Becherglas
- sterile Zentrifugenbecher
- sterile Magnetrührstäbchen

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Pipettierhilfe
- Zentrifuge
- Rührreaktor
- Magnetrührer
- Analysenwaage

3. Lösungen

- PBS⁻
- 70% EtOH
- sterile Essigsäure (0,1%)

4. Durchführung

- Sterile Metallwanne mit PBS⁻ befüllen
- Rattenschwänze einlegen und auftauen lassen
- Rattenschwänze für 2 min in ein 1 l-Becherglas mit 400 ml 70% EtOH einlegen
- Rattenschwänze einzeln mit einer Pinzette entnehmen, in eine Petrischale ablegen und die Schwanzhaut mit einem Skalpell der Länge nach mindestens zu zwei drittel aufschneiden
- Schwanz am Ende der Schnittstelle mit einer Hackenpinzette festhalten, die Haut mit einer zweiten Hackenpinzette abziehen und entsorgen
- Die abgehäuteten Schwänze in eine zweite Metallwanne mit PBS⁻ ablegen
- Die Schwänze mit einer Pinzette am Schwanzende halten und 2-3 cm vom Schwanzende entfernt mit einer Klemmschere abklemmen, drehen und die Sehnen herausziehen
- Die isolierten Sehnen vom Schwanzstück mit einem Skalpell abtrennen und in einer Petrischale mit PBS⁻ Puffer sammeln, Das Schwanzstück verwerfen
- Den Vorgang wiederholen, bis die Sehnen aus dem ganzen Schwanz herausgezogen sind
- Isolierte Sehnenstücke dreimal mit PBS⁻ Puffer spülen. Den Puffer mit einer Pipette vorsichtig absaugen und dabei die Sehnenstücke mit einer Pinzette zurückhalten, damit sie nicht mit abgesaugt werden.
- Die Fasern 1x mit 70% EtOH spülen, vorsichtig absaugen und erneut 70% EtOH zugeben
- 10 min inkubieren zum Zweck der Desinfektion
- Anschließend dreimal mit PBS⁻ Puffer spülen
- 5 ml des letzten Spül-Puffers aus der Petrischale abnehmen und in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren (für Sterilttest)
- restliches PBS⁻ absaugen
- die Fasern in der Petrischale wiegen
- 500 ml Essigsäure in Spinnerflask vorlegen
- Präparierte Fasern mit einer Pinzette in die Spinnerflask überführen
- Sterilen Rührkern zugeben und Flasche verschließen
- Rührreaktoraufsatz aufsetzen
- Im Kühlraum bei 4°C rühren lassen, bis makroskopisch keine Faserreste oder transparente Klumpen erkennbar sind. (2-3 Wochen)
- Kollagenlösung in die Zentrifugenbecher dekantieren
- 1h bei 4°C mit 17.700 xg zentrifugieren

- Kollagenlösung aus allen Zentrifugenröhrchen in einer Glasflasche sammeln und 20 min auf dem Magnetrührer rühren lassen, Flasche mehrmals vom Rührer nehmen und kräftig schütteln
- Probe für die Kollagengehaltsbestimmung entnehmen
- Ggf. fehlende Essigsäuremenge zum Kollagen zugeben
- 20 min auf dem Magnetrührer rühren lassen, Flasche mehrmals vom Rührer nehmen und kräftig schütteln
- in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotieren (zwischen 5 und 10 ml Aliquots) und bei -20°C bis zum Gebrauch lagern

5. Bemerkungen

- Sobald ein Aliquot der Kollagenlösung aufgetaut ist, bei 4°C lagern, innerhalb von 10 Wochen aufbrauchen und nicht wieder einfrieren!

4.4.2 Kollagen Typ II aus Kälberknorpel

Das Kollagen Typ II wird zur Herstellung von elektrogewebenen Matrices verwendet.

1. Materialien

- Kälberknie/Kniegelenke (6-10 Monate alte Kälber (alternativ: Kniegelenke junger Rinder))
- Skalpellhalter mit Skalpellklingen
- Dialyseschlauch MWCO 1400

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Standmixer
- Zentrifuge
- Magnetrührer
- Lyophilisator
- pH-Meter

3. Lösungen

- PBS⁻
- 0,2 M NaOH (100 ml/10 g Knorpel)
- Pepsin (1 g Pepsin/100 g Knorpel)
- 0,1 M Essigsäure

- 0,5 M Essigsäure (500 ml/100 g Knorpel)
- 5 M NaCl
- 20 mM Na₂HPO₂
- (80% Ameisensäure)

4. Durchführung

- Kniegelenk mit Skalpell freilegen, Bänder durchtrennen und Kniescheibe abtrennen
- Knorpel von den einzelnen Knochenbereichen vorsichtig abpräparieren ohne das darunter liegende Knochenmark zu beschädigen
- Waschen des Knorpelmaterials mit PBS⁻
- Knorpel mit Brucheis im Standmixer zu einer homogenen Masse 3-5 min zerkleinern
- Knorpel mind. 24h in 0,2 M NaOH-Lösung Rühren bei RT
- Zentrifugieren der Knorpelmasse bei 3000 xg für 30 min bei 4°C und Überstand verwerfen
- Knorpelstücke 5x mit destilliertem Wasser waschen und jeweils bei 3000 xg 30 min abzentrifugieren
- Pepsinverdau in 0,5 M Essigsäure bei pH 2,8 für mind. 48h bei 4°C bis die Knorpelstücke komplett verdaut waren (evtl. pH Wert über 80% Ameisensäure einstellen)
- ausgefallenes Kollagen bei 3000 xg für 30 min abzentrifugieren

Salzfällung

- Überstand sammeln und langsam (über 45 min) in 5 M NaCl-Lösung geben, bis Endkonzentration von 0,9 M erreicht wird (1:5 Verdünnung)
- Inkubation für ca. 12h bei 4°C unter ständigem Rühren
- ausgefallenes Kollagen bei 3000 xg für 30 min abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- Kollagen in 0,5 M Essigsäure für ca. 12h in 4°C lösen
- zum Ausfällen wiederum 5 M NaCl (1:5) hinzufügen
- Salzfällung insgesamt 3x wiederholen
- Lösen des Kollagens in 0,1 M Essigsäure

Dialyse 1:

- Einfüllen des gelösten Kollagens in die Dialyseschläuche und Enden mit Plastikklemmen gut verschließen
- Dialyse des in 0,1 M Essigsäure gelösten Kollagens gegen 20 mM Na₂HPO₄
- Dialyse erfolgt bis ein pH Wert von >6 im Retentat erreicht wird (3-5 Tage)
- evtl. 20 mM Na₂HPO₄ austauschen, wenn pH<6
- Kollagen fällt bei pH>6 aus

Dialyse 2:

- Kollagen vom Dialysat trennen und in 0,5 M Essigsäure bei 4°C lösen
- Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

- Lyophilisation des gewonnenen Kollagen Typ II in Greinerröhrchen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C lagern

4.5 Herstellung von 3D Biomaterialien auf Kollagenbasis

Kollagen-basierte Materialien sind oft verwendete natürliche Biopolymere, die sehr biokompatibel, bioresorbierbar und ungefährlich sind. Kollagen ist dank seiner Fülle und fehlenden Immunogenität eine außerordentlich gute Trägerstruktur. In diesem Kapitel sind die 3D Biomaterialien auf Basis unterschiedlicher Kollagene, die im Rahmen dieser Arbeit eigens hergestellt wurden, erläutert.

4.5.1 Kollagen Typ I Hydrogel

Zur Herstellung von Hydrogelen erfolgte die Verwendung von gelöstem Rattenschwanz-Kollagen Typ I in 0,1%iger Essigsäure mit einer Konzentration von 10 mg/ml. Für die Zellkultur erfolgte die Mischung des Kollagengels mit Gelneutralisationslösung (GNL) im Verhältnis 3 zu 1, wobei ein Kollagen Typ I Hydrogel mit neutralem pH Wert erreicht wurde. Das Gelieren des Hydrogels erfolgte bei einer einstündigen Inkubation im Brutschrank.

4.5.2 Elektrosinning Matrices

Eine weitere Methode 3D Biomaterialien herzustellen, ist Kollagene durch die Behandlung in einem elektrischen Feld als dünne Fasern zu verspinnen. Das Elektrosinning (ES) ist ein Verfahren zur Herstellung extrem dünner Polymerfasern im Bereich von einigen Nanometern bis zu wenigen Mikrometern.

Zum Verspinnen des Kollagen Typ I wird dieses zuvor lyophilisiert und anschließend in Hexafluorpropylen (7% HFP) über Nacht auf einem Rollenmischer gelöst. Das zuvor isolierte Kollagen Typ II wird ebenfalls lyophilisiert und in 8,7 M Essigsäure (37,5%) über Nacht auf einem Rollenmischer gelöst. Es folgt das Einfüllen der Polymerlösung in Glasspritzen, und das Einspannen in Spritzenpumpen (WPI, USA), über diese die Pumprate gesteuert werden

kann. Edelstahlkanülen, die auf den Spritzenspitzen aufgesteckt sind, sind mit einem Hochspannungsgenerator elektrisch verbunden. Der Transport der Polymerlösungen erfolgt über die Kanülen, die unter Hochspannung stehen und in einem 15 cm Abstand zum Kollektor, der elektrisch geerdet ist, angebracht sind. Abbildung 4.1 (A) zeigt den Versuchsaufbau zur Herstellung von ES-Scaffolds. Das starke elektrische Feld verursacht an der Nadelspitze ein geladener Kollagenstrahl, der von der Nadel extrahiert und als kontinuierliche Faser auf dem Kollektor abgeschieden wird (Abbildung 4.1 (B)). Folglich bildet sich ein Kollagen-Vliesstoff auf der Kollektoroberfläche aus, der über die Zeit an Dicke zunimmt. Eine rotierende Welle fungiert als Kollektor, deren Geschwindigkeit für jede Schicht individuell eingestellt wurde. Die Produktion zufällig ausgerichtete Fasern benötigte dabei eine geringe Drehzahl, während bei einer höheren Drehzahl ausgerichtetete Fasern auf der Kollektorfläche erzielt wurden.

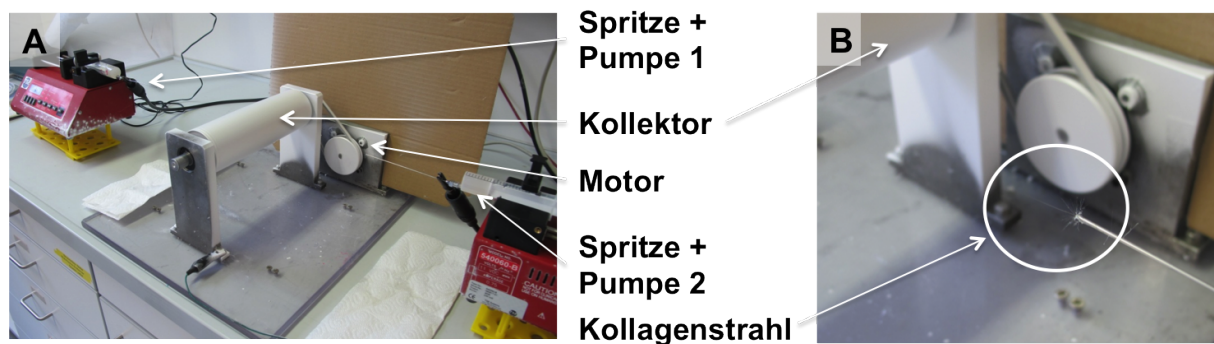


Abbildung 4.1: Aufbau der Elektrospraying-Anlage, zur Herstellung von Kol I/II ES-Scaffolds. Der Kollektor, eine rotierende Welle, die über einen Motor angetrieben wird, ist zwischen zwei Polymerspritzen aufgebaut. Spritzenpumpen fördern die Polymerlösung durch Edelstahlkanülen, die an einem Hochspannungsgenerator angeschlossen sind. Durch die angelegte Spannung bildet sich ein Kollagenjet, über diesen feine Fasern auf dem Kollektor landen.

Der 2-stündige Spinningprozess der ersten und fünften Schicht des Kol I/II Scaffolds mit Kol I erfolgte bei einer Spannung von 13 kV, einer Pumprate von 1,5 ml/h und einer Drehzahl von 1000 rpm, um zufällig ausgerichtetete Kol I Fasern am Rand des Scaffolds zu erhalten. Die zweite und vierte Schicht wurde jeweils 1,5 h mit einer Drehzahl von 2000 rpm versponnen, während eine Spritze mit Kol I und die andere Spritze mit Kol II Lösung gefüllt war. Die Pumprate wurde für die Kol I Lösung auf 0,8 ml/h und für die Spritze mit der Kol II Lösung auf 2 ml/h bei einer Spannung von 25 kV angepasst. Das Spinnen der dritten bzw. mittleren Schicht, erfolgte bei der angelegten Spannung von 30 kV bei der höchsten Drehzahl von 3000 rpm, um ausgerichtetete

Kol II Fasern im Scaffoldinneren zu erhalten. Die Pumprate für die beiden mit Kol II gefüllten Spritzen betrug dabei 0,3 ml/h, der Prozess dauerte für die mittlere Schicht ebenfalls 2h. Die Mikrostruktur der erhaltenen Scaffolds erfolgte an einem Laserscanning Mikroskop.

Folgende Tabelle 4.4 gibt die Kol I/II ES-Scaffolds, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und verwendet wurden an.

Tabelle 4.4: Bezeichnung der verwendeten ES-Scaffolds

Bezeichnung	Crosslinkzeiten [h]	Zelltyp für die Besiedelung
M110216	1,2,3,4	hMSZ14 (P1), hMSZ16 (P2)
M110316	3	hMSZ12 (P2)
M110505	3	hMSZ12 (P2)
M110613	1,2,3,4	hMSZ10 (P2)
M111208	1,2,3,4	kultiviert in Medium, ohne Zellen
M120216	3	hMSZ26 (P4), hMSZ27 (P3)

Die Produktion einer reinen Kol I ES-Matrix erfolgte in einem weiteren vertikalen Versuchsaufbau, während die Fasern aus einer Spritze mit Kol I Lösung von oben auf eine darunterliegende Fläche, dem Kollektor abgezogen werden. Versponnen wird hierbei mit einer Spannung von 13 kV über mehrere Stunden, wobei die Polymerlösung nicht aktiv mit einer Pumpe aus der Spritze transportiert werden, sondern über die Graviationskraft aus der Nadel austritt und die Fasern des erhaltenen Vlies keiner Ausrichtung gehören.

4.5.3 Crosslinken von elektrogenesponnenen Kollagen-Scaffolds

1. Materialien

- Skalpellhalter mit Skalpellklingen
- 50 ml Schottflasche
- Becherglas
- Petrischale
- Pinzette
- sterile Gewebestanze (8 mm)

2. Geräte

- Abzug

- Sicherheitswerkbank
- Vortexer

3. Lösungen

- 99% Hexamethylen-diisocyanat (HMDI)
- 100% Isopropanol
- 70% EtOH
- PBS⁻

4. Durchführung

- Mit einer Gewebestanze kreisrunde Scaffolds aus der Nanofasermatte ausstanzen
- Ansetzen einer 10% HMDI Lösung in Isopropanol
(z. B.: 27 ml Isopropanol + 3 ml HMDI) Plastikpipetten verwenden!!
- Scaffolds in HMDI-Lösung geben und 1h inkubieren (reine Col I ES-Scaffolds), bzw. 1-4h inkubieren (Col I/II ES-Scaffolds)
- HMDI-Lösung langsam in ein Becherglas abkippen und Scaffolds zurückhalten
- Waschen der Scaffolds mit 100% Isopropanol (gleiches Volumen wie 10% HMDI Lösung) für 20 min. Dafür Schottflasche auf Vortexer fixieren (Stufe 5-6)
- Waschschrift insgesamt 3x durchführen
- Scaffolds in Petrischale überführen
- Zum Sterilisieren der Scaffolds: sterile Petrischale mit 70% Ethanol füllen, Scaffolds hinzugeben und 10 min inkubieren
- Ethanolbehandlung insgesamt 2x durchführen
- Scaffolds 3x für mind. 10 min mit PBS⁻ waschen
- PBS absaugen, trockenen lassen
- Petrischale mit Paraffin verschließen (steril halten) und in -20°C lagern

5. Bemerkungen

- Vor dem Besiedeln mit Zellen, Scaffolds zum Auftauen in PBS⁻ geben

4.5.4 Dezellularisierung einer Biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc[®])

Für die spätere Versorgung der 3D Kollagen Biomaterialien dient eine biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc[®]), die natürliche Gefäßstrukturen aufweist und so für die EZ eine geeignete

Trägermatrix darstellt. Die BioVaSc[®] ist ein 10 bis 15 cm langes Darmgewebestück mit erhaltenem Gefäßsystem, das aus deutschen Landrasseschweinen bis 30 kg explantiert, gespült und anschließend dezellularisiert wird (siehe Abbildung 4.2).

1. Materialien

- Schutzbrille
- Atemmaske
- Nitrilhandschuhe
- BioVaSc[®] mit Braunülen (rosa: Arterie, grün: Vene)
- Pinzette
- Schere
- Trichter
- (insterile) 50 ml-Kunststoffspritze
- Kabelbinder
- Venenklemmen
- 250 ml/500 ml Laborglasflaschen mit Anschlüssen unten
- Schlauchsystem mit Pumpschlauch, Schlauchverbindern und Adapter für Druckmessung
- Glasreaktor
- Glasaufsätze
- Edelstahlwanne
- Kunststoffbehälter bzw. braune 500 ml Glasflasche mit Schraubdeckel
- Transportbehälter mit Kühlakkus

2. Geräte

- Ismatec-Pumpe
- Drucksensor
- Wippschüttler im Kühlraum (4°C)
- Sicherheitswerkbank

3. Lösungen

- ca. 1 l AZ-Lösung (34 g Natriumdesoxychelate in 1 l Reinstwasser)
- unter dem Abzug ansetzen!!!
- ca. 7 l PBS⁻-Puffer (insteril)
- ca. 1 l steriler PBS⁻-Puffer
- Gentamicin 10 mg/ml

- Penicillin/Streptomycin 5000 µg/ml
- DNase (200 mg in 500 ml PBS⁺ lösen + 1% PenStrep)

4. Durchführung

Tag 1:

- Transportmedium: PBS⁻ + 1% Gentamicin + 1% PenStrep, kühlen
- PBS⁻ mit 1% Gentamicin und 1% PenStrep versetzen (= Spülpuffer)
- Spülpuffer nur gekühlt verwenden
- BioVaSc[®] in der Edelstahlwanne mit PBS⁻ spülen:
- mit 50 ml-Spritze Gefäßsystem über arteriellen Zugang spülen, bis komplett von Blut befreit
- Darmlumen mittels Spritze mit Spülpuffer befüllen und durch Ausdrücken von Faecesresten befreien
- Vorgang wiederholen, bis Darmlumen komplett sauber (ca. 1 l PBS⁻)
- ü.N. in Spülpuffer bei 4°C auf Wippschüttler lagern

Tag 2:

- AZ-Lösung ansetzen (Lösung nur bei Raumtemperatur verwenden, ü.N. im Kühlraum lagern!) - Bioreaktor vorbereiten
 - Schlauchsystem an Pumpe anschließen und mit PBS⁻ auf eventuelle Luftbläschen kontrollieren
 - Pumpe bei 10 rpm laufen lassen, roten Gefäßzugang benetzen, keine Luftblasen!, Glasaufsatz einstecken
 - Druck soll bei 80 mmHg liegen
 - Pumpe ausschalten
 - durchgeflossenen Puffer mit Spritze aus Glasreaktor absaugen
 - Vorratsflaschen mit AZ-Lösung befüllen und über Schlauchsystem in arteriellen Zufluss (rosa) des Gefäßsystems pumpen
 - unbedingt Nitrilhandschuhe + Schutzbrille tragen!!!
 - Während der ganzen Zeit Druck kontrollieren, muss zwischen 80–100 mmHg liegen!
- Wichtig: Pumpgeschwindigkeit dem jeweiligen Druck anpassen (s.a. Anmerkungen) und Anschlüsse der BioVaSc[®] gegebenenfalls anders positionieren
- Lumen mit Kabelbindern an Glasröhrchen für luminalen Fluss anschließen, Lösung für ca. 15 min einwirken lassen
 - anschließend Pumpvorgang kurz unterbrechen und gesamtes Darmlumen ausdrücken
 - dann erneut Pumpvorgang starten (gebrauchte und frische AZ-Lösung für Darmlumen mischen) und durch das Gefäßsystem nur frische AZ-Lösung pumpen (hier: 80 mmHg)
 - Vorgang so oft wiederholen, bis ca. 500 ml AZ-Lösung durch das Gefäßsystem gepumpt worden sind

- benutzte AZ-Lösung in Schottflasche mit Korsolex sammeln, ü.N. inkubieren, erst dann über den Abguss entsorgen
- danach spülen mit ca. 1 l PBS⁻
- wiederholen, bis die BioVaSc[®] komplett von Zellresten befreit ist („richtig weiß: siehe Abbildung 4.2 (C)); Druck 100 mmHg
- unbedingt beachten: AZ-Lösung muss vollständig entfernt sein!
- BioVaSc[®] komplett mit AZ-Lösung füllen (Lumen komplett und Gefäße vorsichtig mit 2 ml)
- in ein mit AZ-Lösung befülltes Gefäß überführen, auf Schüttler bei 4°C ü.N. inkubieren

Tag 3:

- mit PBS⁻ durch Gefäßsystem und Lumen spülen (ca. 2 l PBS⁻ müssen durch Gefäße gepumpt werden)
- BioVaSc[®] in Spülpuffer lagern, auf Schüttler stellen und Lösung ca. 3x austauschen
- mit DNase ü.N. bei 4°C auf Schüttler inkubieren

Tag 4:

- DNase-Lösung entfernen und mit Spülpuffer herauswaschen
- 3x täglich Spülpuffer im Gefäß ersetzen
- über das Wochenende auf Schüttler bei 4°C inkubieren

Montag:

- BioVaSc[®] in frisches PBS⁻ ohne Antibiotika überführen
- zur γ -Sterilisation:

Kunststoffbehälter gut verschließen, in die vorbereitete Transporttasche mit Kühlakkus („umfallsicher“) verpacken

- Lieferung zur γ -Sterilisation
- zeitnah die nun sterile BioVaSc[®] in sterilen Spülpuffer überführen, bei 4°C lagern
- BioVaSc[®] vor Zellbesiedelung über Nacht in zellspezifischem Medium inkubieren

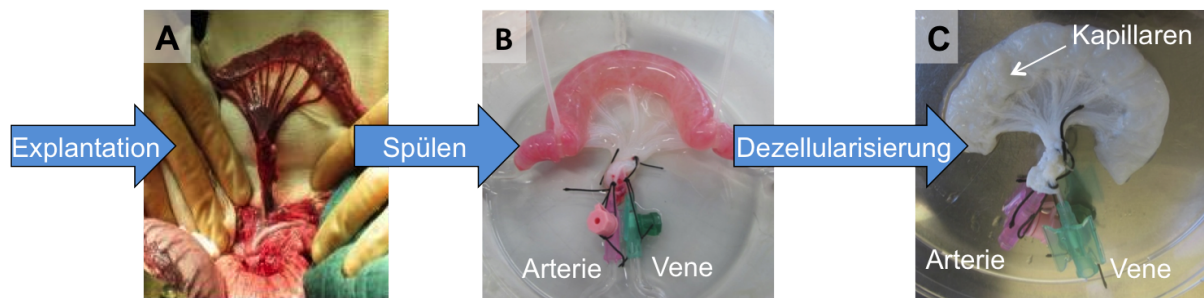


Abbildung 4.2: Herstellung einer biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc®). (A) Explantation der BioVaSc®. (B) Teilsegment eines porcinen Jejunums mit arteriellem und venösem Anschluss. (C) Die BioVaSc® nach Dezellularisierung, die erhaltenen Röhrenstrukturen der Arterien und Venen sind gut zu erkennen.

5. Wichtige Anmerkungen

- Wichtig ist die ständige Kontrolle des Drucks:
- Pumpgeschwindigkeit entsprechend anpassen (während Azellularisierung langsam: 3-10 rpm; während des Spülvorgangs: 10-40 rpm)
- Schlauchsystem während der ganzen Zeit auf Luftbläschen kontrollieren!
- Sollten Luftbläschen erkannt werden, Pumpe ggf. stoppen, Schlauch von Kanüle abstöpseln und bis zur Entfernung der Blasen Flüssigkeit durchpumpen, anschließend die BioVaSc® weiter luftblasenfrei durchspülen.
- Darm sollte vor der γ -Sterilisation mind. 1x über Nacht, max. eine Woche in Spülpuffer gespült werden.
- Die Sterilisation durch γ -Bestrahlung mit 25 kGy ü.N. wird bei der Firma BBF Sterilisationsservice GmbH in Rommelshausen durchgeführt.
- Die Anlieferung und Abholung sollte so organisiert sein, dass die Bestrahlung möglichst bald durchgeführt und die sterile BioVaSc® nur kurz bei BBF ungekühlt gelagert wird.

4.6 Besiedelung von Matrices mit Zellen

Biomaterialien dienen im Tissue Engineering als Zellträger, wobei die natürliche Umgebung für jeden Zelltypen zu berücksichtigen ist. In Vorversuchen werden zunächst 2D Kulturmodelle aufgebaut. Dabei erfolgt die Kultivierung der MZ alleine und der Ko-Kultivierung der MZ mit

mvEZ auf einer synthetischen sowie einer natürlichen Matrix. Weiter erfolgte eine Auswahl geeigneter auf Kollagenbasis hergestellter 3D Scaffolds für die Knorpel- und Stammzellen, wobei die BioVaSc[®] mit ihren erhaltenen Gefäßstrukturen für EZ als geeignete Matrix für die *in vitro* Kultivierung gilt. Schließlich erfolgt zum Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts die Kombination der BioVaSc[®] mit dem ausgewählten 3D Kollagen Biomaterial und die dynamische Kultivierung des Konstrukts in einem Bioreaktor.

4.6.1 Aufbau von 2D Ko-Kulturmodellen

Vorversuche zwei Zelltypen in einem System zu kultivieren, um dabei die Zellcharakterisierung zu untersuchen, fanden auf Basis zweier unterschiedlicher Trägerstrukturen statt. Verwendet wurde zum einen eine synthetische Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) und zum anderen die natürliche kollagenbasierte Trägermatrix, die Collagen Cell Carrier (CCC). Die verwendeten PET Membranen weisen 1 µm große Poren auf, die ein Durchkommen der Zellen durch die Membran verhindern. Dennoch ist eine Kommunikation und Beeinflussung der Zellen untereinander durch Parakrine Sekretion möglich. Die CCC Membran besteht aus bovinem Kollagen Typ I und ist für Flüssigkeiten und Signalmoleküle durchlässig, wohingegen Zellen die Membran nicht passieren können. Bevor die Membran verwendet wurde, war es nötig, sie vorzubehandeln. Zur Beschichtung der CCCs wurde Fibronectin mit einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS⁻ gelöst. Eine Inkubation der Trägermatrix von mind. einer Stunde bei Raumtemperatur in 1 ml Verdünnungslösung folgte, an die sich ein Waschschrift anschloss. Anschließend wurden die CCCs für 30 min in PBS⁻ getränkt bevor sie über Nacht an der Raumluft trockneten.

Mit Hilfe von zweiteiligen Zellkronen aus Stahl erfolgte das Einspannen der Membranen, während sich eine 1 cm² Wachstumsfläche ergab (Abbildung 4.3 (A)). Es ergaben sich somit zwei Kompartimente, ein innerer und ein äußerer Bereich, die mit Zellen besiedelt werden konnten. Am ersten Tag erfolgte die Besiedelung mit $4 \cdot 10^5$ hmvEZ, gelöst in 100 µl Medium auf die äußere Membranseite, an die sich eine Inkubation über Nacht anschloss. Am folgenden Tag wurde die Zellkrone umgedreht und die gegenüberliegende Innenseite der Membran mit hMZ besiedelt. Nach einer Inkubationsdauer von 4h folgte das Fluten der Ko-Kultursysteme mit 1 ml im inneren und 6 ml Medium im äußeren Bereich der Zellkronen. Abbildung 4.3 (B) zeigt den schematischen Aufbau der Zellbesiedelung, sowie die Zellanordnung (Abbildung 4.3 (C)) auf den Trägerstrukturen. Es erfolgten Untersuchungen der 2D Modelle von hMZ mit hmvEZ in Ko-Kultur, sowie hMZ auf den Membranen in der Mono-Kultur als Kontrolle.

Während der gesamten Zeit des Experiments erfolgte kein Medienwechsel der Kulturen. Die

Zellen auf der PET Membran wurden mit einer Trypsinbehandlung abgelöst, gesammelt und für die Anfertigung von Cytospots vorbereitet. Zur Vereinfachung der Zellablösung am Ende des Experiments erfolgte der Zusammenbau in diesem Fall mit zwei PET Membranen. Die CCC Membranen wurden aus den Zellkronen gelöst und eine Stunde in 4% PFA fixiert, bevor die Einbettung der Proben in Paraffin folgte.

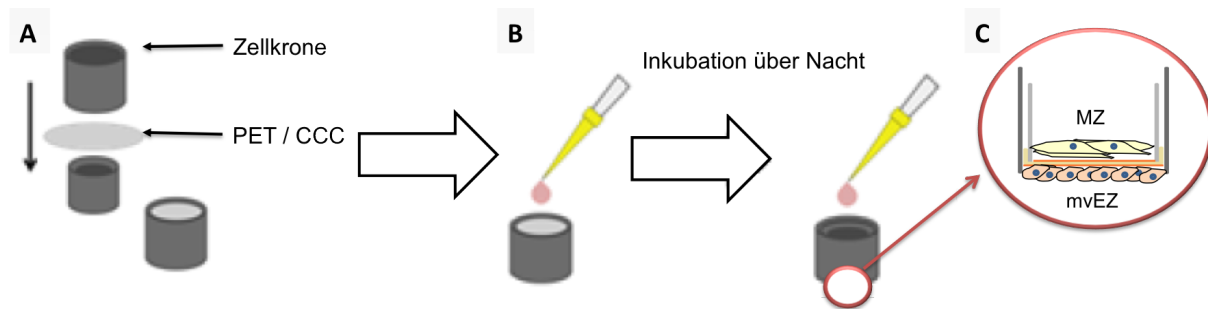


Abbildung 4.3: Skizze des Versuchsaufbaus der 2D Ko-Kulturmodelle. (A) Einspannen und (B) Besiedelung der Matrices in Zellkronen. (C) Zellanordnung auf der Matrix.

4.6.2 Zellbesiedelung biologischer 3D Biomaterialien

Die auf Kollagenbasis hergestellten 3D Biomaterialien, die später als Zellträger für den Aufbau eines Meniskusgewebes verwendet werden sollen, werden mit hMZ und hMSZ besiedelt, um ihre Eignung als Trägerstruktur für diese Zelltypen zu evaluieren. Verglichen wurde die Zellmigration auf sechs unterschiedlichen Biomaterialien. Die bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnten käuflichen Materialien wurden mit dem selbst hergestellten Kollagen-Hydrogel, sowie der ES-Matrix, aus Kol I sowie aus Kol I/II verglichen. Abbildung 4.4 zeigt Bilder der einzelnen Scaffolds, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

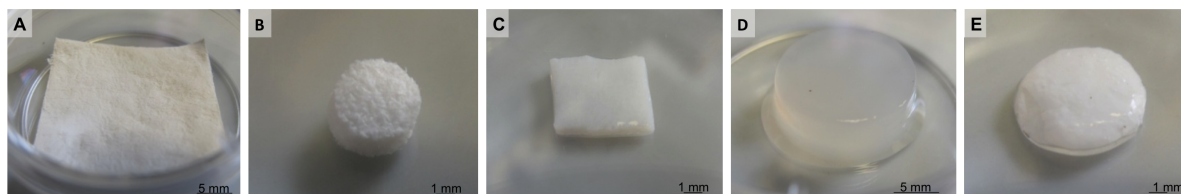


Abbildung 4.4: Abbildung aller verwendeten 3D Kollagen Scaffolds. (A) Bio-Gide Membran, (B) BD Scaffold, (C) Bio-Mesh Matrix, (D) Kollagen I Hydrogel und (E) Kollagen I ES-Matrix.

Vor der Besiedelung erfolgt zunächst das Stanzen der Bio-Gide Membran sowie der Bio-Mash Matrix mit Hilfe einer Biopsiestanze auf eine definierte Größe, in diesem Fall beträgt diese für die beiden Scaffolds 6 mm Durchmesser. Der Durchmesser der BD Scaffolds ist vom Hersteller zwischen 4,2 und 5,2 mm definiert, sowie die Größe der elektrogenesponnenen Kollagen I und Kollagen I/II Scaffolds bereits durch das Stanzen vor dem Crosslinkprozess auf 8 mm Durchmesser festgelegt ist und aufgrund des Schrumpfungsverhaltens der Scaffolds nach der Crosslinkbehandlung dieser dann ca. 6 mm beträgt. Durch das Gießen der Hydrogele in 12-Well Platten sind auch diese von definierter Größe.

Zur Zellbesiedelung erfolgt das Überführen der kreisrunden Scaffolds in 96-Well Platten, in denen pro Well $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 50 μl zellspezifisches Medium pipettiert werden. Weitere, geringere Zellaussaatdichten ($0,5 \cdot 10^4$, $0,1 \cdot 10^5$, $0,5 \cdot 10^5$, $0,1 \cdot 10^6$) wurden getestet, wobei die besten Besiedelungsergebnisse bei der Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/Scaffold erzielt wurden. Nach einer 3-stündigen Adhärenzdauer erfolgt die Zugabe von weiteren 100 μl zellspezifischen Medium pro Scaffold. Am darauffolgenden Tag werden die zellbesiedelten Scaffolds aus den 96-Well Platten in 12-Well Platten umgesetzt und mit jeweils 2 ml frischem Kulturmedium bedeckt und für 7 Tage kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgt alle 3 bis 4 Tage.

Zur Besiedelung des Kollagen I Hydrogels (Abbildung 4.4 (D)) erfolgte zunächst die Resuspension der abgelösten Zellen in GNL. Anschließend wurde das Kollagengel mit der Zellsuspension luftblasenfrei resuspendiert. Dabei war zu beachten, dass bei diesem Schritt alle Lösungen gekühlt und zügig vermischt werden, um ein vorzeitiges Gelieren des Hydrogels zu verhindern. Analog zu den vorherigen 3D Biomaterialien erfolgte die Austestung unterschiedlicher Zelldichten im Hydrogel, wobei auch hier mit $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml die beste Zellverteilung erreicht wurde. Die Kultivierung des Hydrogels erfolgte in 12-Well Platten für 7 Tage, wobei 1 ml Hydrogel pro Well pipettiert, für 1h im Brutschrank geliert und anschließend mit 2 ml zellspezifischem Medium bedeckt wurde. Der Medienwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage.

Die Besiedelung der Biomaterialien wurde für jeden Zelltyp insgesamt mit drei unterschiedlichen Spendern wiederholt.

4.6.3 Rebesiedelung der BioVaSc[®] mit Endothelzellen

Vor der Ko-Kultur erfolgt zunächst die Rebesiedelung der erhaltenen Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] mit primären mvEZ, um das Vaskularisationssystem wieder herzustellen.

1. Materialien

- Schlauchsystem mit Pumpschlauch, Schlauchverbindern und Adapter (Druckdom) für Druck-

messung

- Glasreaktor
- Glasaufsätze
- Glaskanülen
- azellularisierte, sterile BioVaSc[®]
- 2x 50 ml Schott-Glasfläschchen mit 3 Zu-/Abflüssen mit Gummidichtung im Deckel
- Metallschelle
- Pinzetten
- Pipetten

2. Geräte

- Ismatec-Pumpe
- Drucksensor
- Sicherheitswerkbank

3. Lösungen

- VascuLife[®] + 1% PenStrep
- PBS⁻
- PBS⁻/EDTA
- Trypsin
- FCS

5. Durchführung

Tag 0:

- Reaktorsystem entsprechend des Schemas (siehe Abbildung 4.5 (A)) zusammenbauen und autoklavieren lassen.
- Zum Autoklavieren, Aufbau in durchsichtigen Abfallsack stecken und mit Autoklavierband verschließen (nicht zu fest zukleben, geringer Gasaustausch soll stattfinden können).
- Da der Druckdom nicht autoklavierbar ist, diesen erst am nächsten Tag unter der Sterilbank anschließen.
- Zum Autoklavieren die entsprechenden Luer-Lock-Verbindungssteile mit Alufolie umwickeln.
- PBS⁻-Puffer aus dem Glas, in dem BioVaSc[®] gelagert wird, absaugen und durch VascuLife[®] ersetzen und bis zum nächsten Tag im Kühlraum aufbewahren.

Tag 1:

- Reaktorsystem unter der Sterilbank mit VascuLife[®] so weit füllen, dass Mediumspiegel in beiden 50 ml Glasfläschchen und im Glasreaktor ca. 2 cm beträgt.

- BioVaSc[®] in Reaktor legen.
- $4 \cdot 10^6$ Endothelzellen ablösen und in 4 ml VasuLife[®] aufnehmen.
- 5 ml-Spritze ohne Stopfen auf rosa Kanüle der BioVaSc[®] setzen (arterieller Zufluss des Gefäßsystems)
- 4 ml Zellsuspension in Spritze pipettieren und Stopfen langsam aufsetzen.
- Zellen vorsichtig und langsam in Gefäßsystem der BioVaSc[®] spritzen.
- Darauf achten dabei keine Luftblasen in das System zu bringen.
- Reaktorsystem schließen und 2–3h inkubieren in Inkubatorwand. Für diese Zeit keinerlei Fluss anlegen.
- Während der Inkubationszeit erneut $4 \cdot 10^6$ Endothelzellen ablösen und in 4 ml VasuLife[®] aufnehmen
- Reaktor wieder unter der Bank öffnen, BioVaSc[®] wenden und unter Verwendung einer 5 ml-Spritze die Zellsuspension über den arteriellen Zugang in die BioVaSc[®] einbringen.
- Reaktorsystem mit Metallschelle schließen und 2–3h inkubieren in Inkubatorwand. Für diese Zeit keinerlei Fluss anlegen.
- Anschließend kontinuierlichen Fluss bei 10 rpm ü.N. anlegen.
- Dazu den arteriellen Zufluss (rosa) mit einer Pinzette an die zuführende Glaskanüle (diejenige, die mit der Druckflasche über den Druckdom verbunden ist) fest aufsetzen.

Tag 2:

- Der Medienspiegel sollte zu diesem Zeitpunkt weiterhin etwa 2 cm im Reaktor betragen und Reservoir- sowie Druckflasche sollten zu mindestens 3/4 gefüllt sein.
- Druckfühler an Druckdom anschließen und regulierten Fluss bei 80–120 mmHg starten.
- Einstellungen gemäß Angaben unter Abschnitt „C-Control“.

C-Control:

- Reset-Taste betätigen und warten bis Anzeige alle 4 möglichen Optionen (Regelung, Treppe, alternierend, konstant) durchlaufen hat
- Nummer 1 wählen für „Regelung“, Eingabe mit der Taste "Enter" bestätigen
- Mittelwert festlegen, normalerweise „100“ für BioVaSc[®] vom Schwein, Eingabe mit "Enter" bestätigen
- Amplitude festlegen, normalerweise „20“ für BioVaSc[®] vom Schwein, Eingabe mit "Enter" bestätigen
- Iterationswert I1 festlegen, normalerweise „20“ für BioVaSc[®] vom Schwein, Eingabe mit "Enter" bestätigen
- Pumpe startet
- Druckverlauf anpassen: Soll-Wert (blaue Kurve) durch Ist-Wert (rote Kurve) nachahmen.
3 Möglichkeiten durch die man den Ist-Wert beeinflussen kann:
 - Metallklemme am Bypass zudrehen oder lockern (Druckniveau anheben oder senken)

- Stellhebel an Pumpschlauchhalter festziehen oder lockern (Druckniveau anheben oder senken)
- Anteil Luft in Druckflasche verringern oder erhöhen (Kurvenamplitude erhöhen oder abflachen)

Folgende Vorgehensweise hat sich bewährt, während Pumpe läuft:

- Die zunächst geöffnete Metallklemme am Bypass so weit schließen, bis Ist-Wert leicht oberhalb des Soll-Wertes liegt. Falls Druckniveau nicht durch Schließen der Metallklammer alleine zu erreichen ist, Stellhebel an Pumpschlauchhalter schrittweise festziehen.
- Druck nun durch langsames Lösen der Metallklammer auf ein mittleres Level um ca. 100 mm-Hg absenken.
- Anschließend Anpassung der Amplitudenhöhe durch Entfernen der Luft aus der Druckflasche, indem man die Bläschen an den Bypass zur Reservoir-Flasche führt. Je weniger Luft in der Druckflasche, desto höher die Amplitude. So viel Luft entfernen, bis Amplitude der Ist-Kurve derjenigen der Soll- Kurve entspricht.

6. Bemerkungen

- Medienwechsel 2x die Woche, jeweils ca. 50 ml.

4.6.4 Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts

Nach der zweiwöchigen Kultivierungsdauer der EZ in den Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] erfolgte der Aufbau eines 3D Ko-Kultursystems. Dazu erfolgte zunächst die Resuspension von $2 \cdot 10^6$ MZ mit 1 ml GNL und 3 ml Kollagengel (10 mg/ml). Das dabei entstandene 4 mL Kollagen-Typ I Hydrogel wurde in das frühere Lumen der BioVaSc[®] gegeben, wobei die offenen Enden des Darmstücks mit Clips verschlossen wurden. Das aufgebaute 3D Ko-Kultursystem wurde eine weitere Woche im Bioreaktor unter pulsatilem Medienfluss kultiviert, wobei die MZ mit VascuLife[®] Medium über das wieder hergestellte Gefäßsystem versorgt wurden. Abbildung 4.5 (D) zeigt schematisch den Aufbau des 3D Ko-Kultursystems mit EZ besiedelten Kapillaren und dem ausgefüllten Lumen der Matrix mit einem Kollagen-Typ I Hydrogel, das MZ beinhaltet.

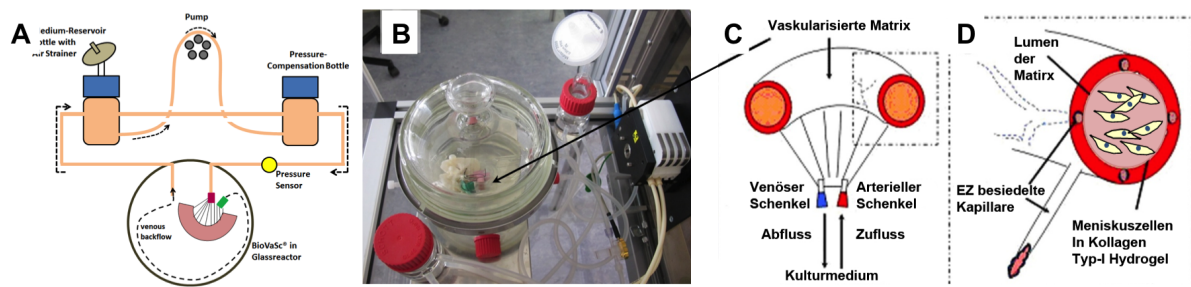


Abbildung 4.5: Schema der dynamischen Kultur und Aufbau eines 3D Meniskuskonstrukts. (A) Schematische Abbildung des Bioreaktors zur dynamischen Kultur. (B) Das Meniskuskonstrukt wird im Bioreaktor kultiviert. (C) Das Gefäßnetz wird der BioVaSc[®] mit mvEZ rebesiedelt. (D) Nach zwei Wochen Rebesiedelungskultur wird ein Kollagen-Typ-I-Hydrogel mit MZ in das Lumen der BioVaSc[®] gegeben und eine Kokultur etabliert.

Insgesamt wurden fünf Ansätze durchgeführt. Versuch I, II und III mit jeweils humanen Zellen, Versuch IV und V mit porcinen Zellen. Bei allen Versuchsansätzen wurde nach zwei Wochen ein kleines Stück der rebesiedelten BioVaSc[®] abgetrennt und mittels MTT Test, histologisch und immunhistologisch analysiert. Nach insgesamt dreiwöchiger Kulturdauer erfolgte das Abstoppen der Versuche und die Analyse der Vitalität, der Integration und Charakterisierung der Zellen.

4.7 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung der Morphologie und Dichte der Kollagenfaserkonstrukte wurden die elektrogewebenen Scaffolds in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) im Modus der Sekundärelektronen (Back scattered) untersucht. Die Proben werden mit einem Elektronenstrahl, der in einem bestimmten Muster geführt (gerastert) wird, gescannt. Trifft der Elektronenstrahl auf das vergrößert abzubildende Objekt, sind verschiedene Wechselwirkungen möglich, deren Detektion Informationen über die Beschaffenheit des Objekts geben. Die Intensität des Signals wird ausgewertet und ein Bild erzeugt, welches die Abbildung der Objektoberfläche ist und eine hohe Schärfentiefe aufweist. Objekte können bis auf das 100.000 fache vergrößert werden. Die mikroskopische Analyse verlangte zunächst das Aufkleben der ausgestanzten Scaffolds auf leitfähige Plättchen. Diese wurden auf einem Probentisch fixiert und anschließend unter Vakuum (12 V, 20 mA, 0,1 mbar, 4 min) mit einer dünnen Goldschicht bedampft, um eine leitfähige

Schicht zur Vermeidung von Bildartefakten infolge einer statischen Aufladung der Proben zu erzielen. Die REM Aufnahmen erfolgten bei einer einheitlichen Beschleunigungsspannung von 5 kV und einem variablen Arbeitsabstand zwischen 12 und 17 mm.

4.8 Zelltoxizitätstestung

4.8.1 Zellviabilitätstest MTT

Mit diesem Viabilitätstest können Zellvitalität und Proliferation visualisiert werden. Auch die Vitalität rebesiedelter EZ in komplexen 3D Gefäßstrukturen oder MZ in Kollagen-I Hydrogel kann damit sichtbar gemacht werden. Der MTT Test basiert auf der Reduktion des gelben Reagenz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein wasserunlösliches Formazan. Makroskopisch wird dies aufgrund von Formazankristallen mit einer lila-blau Färbung angezeigt.

1. Materialien

- Wägeschälchen
- sterile Pipetten und Pasteurpipetten Sterilfilter
- Einmalspritze 2ml-Reaktionsgefäße, steril 15ml-Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Waage
- Vortexer
- Pipettierhilfe
- Fotoapparat

3. Chemikalien und Lösungen

- MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromid) (lichtempfindlich!)

Ansetzen des MTT-Reagenz:

- 60 mg MTT in 20 ml VE-Wasser lösen (=3 mg/ml) sterilfiltrieren
- 2 ml-Aliquots bei -20°C lagern

4. Durchführung - qualitativ

- angesetztes MTT-Reagenz (3 mg/ml) auftauen lassen und vortexen
- 2 ml MTT-Reagenz mit 4 ml zellspezifischem Medium im Zentrifugenröhrchen mischen (= 1 mg/ml)
- Zellen mit MTT-Gemisch überschichten
- 90 min im Brutschrank inkubieren
- Reagenz absaugen, mit PBS⁺ waschen
- Fotodokumentation

4.8.2 Lebend-Tot-Färbung

Die Lebend-Tot-Färbung erfolgte zur Überprüfung der Vitalität der Stammzellen auf den kollagenbasierten, elektrogenen Trägermaterialien.

1. Materialien

- 1,5/2 ml Eppendorfgefäße
- Pipetten und Pipettenspitzen

2. Geräte

- Abzug

3. Lösungen

- PBS⁻

4. Chemikalien

- LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells
- Calcein (4 mM in anhydrous DMSO)
- EthDh (Ethidium Homodimer-1; 2 mM in DMSO/H₂O 1:4 (v/v))

5. Durchführung

Herstellung der Gebrauchslösung:

- 1 µl Calcein + 4 µl EthDh + 1995 µl PBS⁻

Ablauf der Färbung:

- Kulturmedium absaugen
- Zellen/Gele 1x mit PBS⁻ spülen

- einige Tropfen der Gebrauchslösung auf Zellen geben und 10 s einwirken lassen
- 500-1000 µl auf Gel geben und 30 min einwirken lassen
- 1x mit PBS⁻ waschen und sofort mit Fluoreszenzmikroskop mikroskopieren
- Vitale Zellen erscheinen unter Anregung bei 480 nm mit einem Maximum bei 515 nm grün.
- Tote Zellen werden rot gefärbt, das bei einer Anregung im Bereich von 536 nm Licht der Wellenlänge 611 nm emittiert.
- Um eine Aussage über die Vitalität der Zellen im inneren Bereich treffen zu können, erfolgt die Aufnahme des Querschnitts.
- Dazu die gefärbten Proben fixieren, in TissueTek[®] einbetten und kryoschneiden

4.9 Histologie und Immunhistologie

Histologische Übersichtsfärbungen dienen der Analyse von Zellmigration in Biomaterialien. Mittels immunhistologischer Färbungen erfolgt die Analyse der Zellcharakterisierung.

4.9.1 Zellfixierung

1. Materialien

- 6-Well Platte oder Zentrifugenröhrchen
- Glaspipetten
- Pasteurpipetten
- Einbettkassetten und Filterpapier
- Glasmesskolben (5 l, mit Stopfen)
- Einmalpipette
- lösungsmittelfester Stift

2. Geräte

- Abzug
- Pipettierhilfe
- Heizrührer
- Einbettautomat

3. Chemikalien

- 4% gepuffertes PFA
- 1 N NaOH
- 1 N HCl

4. Lösungen

- PBS⁻
- Leitungswasser

5. Durchführung

- Gewebe durch Spülen mit PBS⁻ von Medienresten befreien und in geeignetes Fixierungsgefäß (z.B. 6-Well Platte oder Zentrifugenröhrchen) überführen

Ab hier unter dem Abzug weiterarbeiten:

- Gewebe in 4% PFA tränken (Einmalpipette verwenden und diese unter dem Abzug 2 Tage ausdampfen lassen)
- Inkubation unter dem Abzug oder bei 4°C mit geschlossenem Deckel (Inkubationszeit und Temperatur ist von der Art des Gewebes abhängig: Hautmodelle/BioVaSc[®]: 2h, Biopsate: ü.N.)
- PFA mit Einmalpipette in Fixiermittelabfall überführen
- Gewebe mit Leitungswasser spülen, dies auch in Fixiermittelabfall überführen
- Gewebe in Einbettkassetten mit Filterpapier überführen
- 2h in einem mit Leitungswasser gefüllten Becherglas wässern
- Gefäße und Pipetten, die mit PFA in Berührung gekommen sind, bis zum nächsten Tag unter dem Abzug ausdampfen lassen.
- Gewebe einbetten

4.9.2 Paraffineinbettung

1. Materialien

- 2ml-Reaktionsgefäße oder 50ml-Zentrifugenröhrchen
- Einbettkassetten
- Einmalpipetten
- lösungsmittelfester Stift
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Abzug
- Eppendorf-Pipetten
- Wärmeschrank (60°C)

3. Lösungen

- Ethanol (50%, 70%, 90%, 96%)
- Isopropanol = 2-Propanol
- Leitungswasser
- PBS
- Roti-Plast Paraffin
- Xylol

4. Durchführung

- Überführen der Proben in Einbettautomaten
- für manuelle Einbettung: fixierte Präparate in entsprechende Gefäße (z. B. 2 ml-Reaktionsgefäße oder 50 ml-Zentrifugenröhrchen) überführen

Zeitablauf [h]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
1-2h	Leitungswasser	wässern
ü.N. (Minstdauer: 1h)	EtOH 50%	
1	EtOH 70%	Dehydratisierung
1	EtOH 90%	
1	EtOH 96%	
1	Isopropanol I	
1	Isopropanol II	
1	Isopropanol/Xylol (1:2)	Inkubieren bei RT
1	Xylol I	
1	Xylol II	
ü.N.	Paraffin I	Inkubieren im Wärmeschrank bei 60°C
2	Paraffin II	

Es folgt das Blocken der Proben in einen Paraffinblock, von diesem dann 3 bis 6 µm dicke Schnitte mit Hilfe des Schlittenmikrotoms abgetragen werden können. In einem 50°C warmen Wasserbad werden die Paraffinschnitte gestreckt und auf Glasobjektträger gezogen und

bei 37°C getrocknet. Histologische Färbungen finden an Paraffinschnitten auf unbeschichteten Objektträgern statt, während die Durchführung immunhistologischer Untersuchungen auf silanbeschichteten Objektträgern erfolgt.

4.9.3 Zellen auf Cytospots

Cytospots erfolgten im Rahmen dieser Arbeit von den 2D Vor-Versuchen auf PET Membranen, da sich die Membranen nicht in Paraffin einbetten lassen.

1. Materialien

- Glasobjektträger
- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Pipettenspitzen
- Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Absaugeinrichtung
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Eppendorfpipetten
- Pipettierhilfe
- Sicherheitswerkbank
- Wasserbad (37°C)
- Cytozentrifuge

3. Lösungen

- Zellkulturmedium

4. Durchführung

- Ablösen der Zellen von der Zellkulturoberfläche:
- Werkbank anschalten, 15 min laufen lassen, Arbeitsfläche mit 70%EtOH absprühen, mit Einwegtüchern abwischen
- sterile Glas- und Pasteurpipetten unter Werkbank öffnen
- Zellen nach SOP „Passagieren von Zellen“ ablösen

- Zellen in einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^5$ hmvEZ bzw. $0,25 \cdot 10^5$ hMZ in 50 μ l Medium aufnehmen
- Fixierung der Zellen auf Glasobjektträgern:
- in spezielle Halterungen übereinander zuerst den Objektträger, dann ein Filterpapier und zum Schluss einen Trichter einspannen
- vorbereiteten Objektträger in das Probenkarussell der Cytozentrifuge eingesetzt
- 50 μ l der Zellsuspension auf den Grund des Trichters pipettieren
- Proben bei 500 U/min für 5 min zentrifugiert
- die auf den Objektträgern befindlichen Zellen bei Raumtemperatur trocknen lassen
- evtl. Lagerung im Gefrierschrank bei -20°C (siehe Bemerkung!)
- Filterpapier trocknen lassen (kann wiederverwendet werden)
- Trichter mit Seifenwasser säubern und ebenfalls trocknen lassen
- vor der Färbung Zellen auf Objektträgern fixieren für 10 min mit kaltem Ethanol/Aceton Gemisch (1:2).

4.9.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) gilt als standardisierte Übersichtsfärbung verschiedener Gewebestrukturen, durch die Lokalisation der Zellen und Zelldichte in Biomaterialien dargestellt werden können.

1. Materialien

- Messzylinder
- 250 ml-Laborflasche
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläser
- Pinzette

2. Geräte

- Abzug
- Wärmeschrank (60°C)

3. Chemikalien

- Xylol
- Ethanol (96%, 70%, 50%)
- Hämalan
 - o 1,2 g Hämatoxylin
 - o 0,2 g Natriumjodat
 - o 20 g reines Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat
 - o Zutaten in 500 ml VE-Wasser unter Schütteln lösen, bis die Lösung eine blau-violette Farbe annimmt
 - o 20 g Chloralhydrat
 - o 1 g Zitronensäure
 - o weitere Zutaten zugeben Farbton schlägt nun in rot-violett um
 - o mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen
 - o Lösung ü.N. rühren
 - o Lösung vor Verwendung ca. 4 Wochen in geöffneter Flasche stehen lassen
- HCl-Alkohol
 - o 100 ml 50% EtOH in Messzylinder vorlegen
 - o 13,7 ml 1 M HCl zupipettieren
 - o auf 200 ml mit 50% EtOH auffüllen
 - o in Schottflasche überführen und gut mischen
- Eosin
 - o 1 g Eosin in 100 ml VE-Wasser lösen
- 2-Propanol = Isopropanol
- organisches Eindeckmittel Entellan

4. Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser

5. Durchführung

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1h in den Wärmeschrank stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
 - direkt in Xylol I überführen
- Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
60		Schmelzen des Paraffins bei 60°C im Wärmeschrank
10	Xylol I	absteigende Reihe: Entparaffinieren
10	Xylol II	
2	EtOH 96% I	
2	EtOH 96% II	
2	EtOH 70%	
2	EtOH 50%	
	VE-H ₂ O	schwenken, bis keine Turbulenzen mehr
8	Hämatoxylin	Färbung der Zellkerne
	VE-H ₂ O	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
2 mal kurz eintauchen	HCl-Alkohol	Differenzieren
	VE-H ₂ O	Spülen
5	warmes Leitungswasser	Bläuen
1	Eosin	Färben des Zytoplasmas
	VE-H ₂ O	spülen, bis keine Farbe mehr auswäscht
2 mal kurz eintauchen	EtOH 70%	aufsteigende Reihe: Entwässern
2	EtOH 96%	
5	2-Propanol I	
5	2-Propanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen
- mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern

6. Ergebnis

Die Färbung saurer Moleküle erfolgt durch Hämatoxylin, bei der alle basophilen Strukturen, wie z.B. die Zellkerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau erscheinen. Eosin ist ein synthetischer, negativ geladener Farbstoff, der alle basischen acidophilen Strukturen, vor allem die Zellplasmaproteine, rot anfärbt (Übersichtsfärbung).

4.9.5 Ölrot Färbung

1. Materialien

- Deckgläser
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Abzug

3. Chemikalien

- 99% Isopropanol = 2-Propanol
- Oilred O
- 4% PFA
- 60% Isopropanol
- Hämatoxylin
- wässriges Eindeckmittel Aquatex

4. Lösungen

- Leitungswasser
- PBS⁻
- VE-Wasser

5. Durchführung

Herstellung der Färbelösung zum Anfärben der Lipidtröpfchen:

- Stammlösung: 0,5 g Oilred O in 100 ml 99%igem Isopropanol lösen
- Gebrauchslösung: 6 Teile der Stammlösung mit 4 Teilen VE-Wasser mischen, 24h stehen lassen und vor Gebrauch filtrieren

Ablauf der Ölrot-Färbung:

Beachten: Alle Lösungen werden in die halogenfreien organischen Lösemittelabfälle entsorgt.

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
1x spülen	PBS ⁻	
10	4% PFA	fixieren
1x waschen	VE-Wasser	

5	60% Isopropanol	
10	Färbelösung (vom Vortag!)	Anfärben der Lipidtröpfchen
1x waschen	60% Isopropanol	
1x waschen	VE-Wasser	
30 sec	Hämatoxylin	anfärben der Zellkerne
1	Leitungswasser	bläuen

- Objektträger in VE-Wasser überführen
- mit Aquatex und einem Deckgläschen wässrig eindecken (luftblasenfrei!)
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

6. Ergebnis

- Die Zellkerne sind blau, die Lipidtröpfchen rot angefärbt (adipogene Differenzierung).

4.9.6 Alizarin Rot S-Färbung

1. Materialien

- Deckgläser
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Abzug

3. Chemikalien

- Methanol
- Alizarin Red S
- 25% Ammoniak
- wässriges Eindeckmittel Aquatex

4. Lösungen

- PBS⁻
- VE-Wasser

5. Durchführung

Herstellung der Färbelösung:

- Stammlösung: 0,25 g Alizarin Red S in 25 ml VE-Wasser lösen
- Gebrauchslösung: 20 µl 25%igen Ammoniak für 2 ml Stammlösung frisch zugeben

Ablauf der Alizarin Red S-Färbung:

Beachten: Alle Lösungen werden in die halogenfreien organischen Lösemittelabfälle entsorgt.

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
1x spülen	PBS ⁻	
10	Methanol (eiskalt!)	fixieren
1x waschen	VE-Wasser	
2	Färbelösung	anfärben der Kalziumhydrogenphosphate
3x waschen	VE-Wasser	

- mit Aquatex und einem Deckgläschen wässrig eindecken (luftblasenfrei!)
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

6. Ergebnis

- Kalziumhydrogenphosphat wird rot angefärbt (osteogene Differenzierung).

4.9.7 Alcianblau Färbung**1. Materialien**

- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter

- Deckgläser
- Pinzette

2. Geräte

- Abzug
- Wärmeschrank (60°C)

3. Chemikalien

- Aluminiumsulfat
- Alcianblau 8GX
- Essigsäure 100%
- EtOH (96%, 70%, 50%)
- 2-Propanol = Isopropanol
- Kernechtrot
- Xylol

4. Lösungen

- VE-Wasser

5. Durchführung

Herstellung der Lösungen:

- Kernechtrot: 5 g Aluminiumsulfat in 100 ml VE-Wasser lösen, erhitzen bis zum Kochen, 0,1 g Kernechtrot zugeben und nach dem Abkühlen filtrieren.
- 1% Alcianblau: 1 g Alcianblau 8GX in 100 ml VE-Wasser lösen
- 3% Essigsäure: 3 ml 100% Essigsäure mit 97 ml VE-Wasser verdünnen

Ablauf der Alcianblau-Färbung:

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1h in den Wärmeschrank stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
- direkt in Xylol I überführen

Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
10	Xylol I	absteigende Reihe: Entparaffinieren
10	Xylol II	
2	EtOH 96% I	
2	EtOH 96% II	
2	EtOH 70%	

2	EtOH 50%	
	VE-H ₂ O	schwenken, bis keine Turbulenzen mehr
3	3% Essigsäure	
30	1% Alcianblau 8GX	Anfärben der Glykosaminoglykane
	VE-H ₂ O	Spülen
5	Kernechtrot	Anfärben der Zellkerne
	VE-H ₂ O	Spülen
2 mal kurz eintauchen	EtOH 70%	differenzieren
2	EtOH 96%	aufsteigende Reihe: Entwässern
5	2-Propanol I	
5	2-Propanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen
- mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken
- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

6. Ergebnis

- Die Alcianblau Färbung dient der Darstellung saurer Mukosubstanzen oder Glykosaminoglykane (GAG), die die Grundsubstanz von Knorpelgewebe und Extrazellulärmatrix darstellen. Diese kommen auch in erfolgreich chondrogen differenzierten MSZ Kulturen vor. Alcianblau ist ein wasserlöslicher, basischer Phthalocyaninfarbstoff. Die blaue Farbe ist zurückzuführen auf das Kupfer im Molekül. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt mit Kernechtrot.

4.9.8 Movat-Pentachrom Färbung

1. Materialien

- 250 ml-Laborflasche
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Messzylinder

- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläser
- Pinzette

2. Geräte

- Abzug
- Wärmeschrank (60°C)

3. Chemikalien

- Xylol
- Ethanol (96%, 70%, 50%)
- Alicanblau: 1 g Alicanblau + 1 ml konz. Essigsäure + 100 ml VE-Wasser
- Eisenhämatoxylin:
 - o Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml 96% EtOH lösen (unter Erwärmung, bis Farbe rotbraun erscheint)
 - o Lösung B: 2,48 g Eisen-III-Chlorid Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) in 100 ml VE-Wasser lösen + 1ml konz. HCl,
oder 1,16 g Eisenchlorid und 1 ml 25%ige HCl in 100 ml VE-Wasser lösen
- Brilliant Crocein-Säurefuchsin
 - o Lösung A: 0,1 g Brilliant Crocein R + 0,5 ml konz. Essigsäure und 99,5 ml VE-Wasser
 - o Lösung B: 0,1 g Säurefuchsin + 0,5 ml konz. Essigsäure und 99,5 ml VE-Wasser
 - o Gebrauchslösung: 8 Teile Lösung A und 2 Teile Lösung B, mehrere Monate haltbar
- Saffron du Gatinais: 6 g Saffron du Gatinais in 100 ml 96%igem EtOH lösen; 48h bei 50°C in luftdichter Flasche extrahieren (unter Luftabschluss, also wasserfrei haltbar) + lichtempfindlich!
- Alkalischer Alkohol: 10 ml Ammoniumhydroxid + 90 ml 96%iger EtOH (oder 180 ml 95%iger EtOH + 20 ml konz. NH_3)
- 5%ige Phosphorwolframsäure
- konz. 0,5%ige Essigsäure
- konz. HCl

4. Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser

5. Durchführung

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)

- direkt in Xylol I überführen

Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
10	Xylol I	absteigende Reihe: Entparaffinieren
10	Xylol II	
2	EtOH 96% I	
2	EtOH 96% II	
2	EtOH 70%	
2	EtOH 50%	
	VE-H ₂ O	schwenken, bis keine Turbulenzen mehr
10	1% Alcianblau 8GX	Färbung von negativ geladenen sulfatierten Proteoglykanen
5	VE-H ₂ O	Spülen
60	alkalischer Alkohol	Fixierung von Alcianblau
5	VE-H ₂ O	Spülen unter fließendem Wasser
10	Eisenhämatoxylin	Färbung der Zellkerne
1	VE-H ₂ O	Spülen unter fließendem Wasser
15	Leitungswasser	Wässern
30	Brillant Crocein Säurefuchsin	Färbung der elastischen Fasern und des Zytoplasmas
	0,5% Essigsäure	Spülen
15	5% Phosphorwolframsäure	Differenzieren
5	0,5% Essigsäure	Spülen, bewegen
2x5	EtOH 100%	Spülen
60	Saffron du Gatinais	Färbung von mineralisiertem Knorpelgewebe
2x4	EtOH 96%	Entwässern
5	Xylol	Aufhellen

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen

- mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken

- über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

6. Ergebnis

Die Pentachrom Färbung nach Movat eignet sich als Übersichtsfärbung, um zwischen proteoglykan- und glykosaminoglykanreiches Gewebe als auch elastische Fasern zu unterscheiden. So erscheint Knochengewebe leuchtend gelb (Saffron du Gatinais), nicht mineralisierter Knorpel in blaugrün (Saffron du Gatinais), Bindegewebe stellt sich in dieser Färbung grün rötlich (Brilliant Crocein-Säurefuchsin) dar und Zellkerne blauschwarz (Eisenhämatoxylin).

4.9.9 Immunhistologische Färbung

Bei der Immunhistochemie handelt es sich allgemein um eine Methode, bei der Proteine durch die Zugabe von Antikörpern eingefärbt und sichtbar gemacht werden. Dadurch lässt sich eine genaue Lokalisation des Proteins vornehmen. Bei der Hämatoxylinfärbung wird mit Hämalaun eine Kernfärbung als Kontrastfärbung eingebracht. Die Färbung zeigt hier zart-blaue Kerne.

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel
- Trägerkorb
- Feuchtekammer
- Reaktionsgefäße
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen
- Deckgläser

2. Geräte

- Eppendorf-Pipetten
- Wärmeschrank (60°C)

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Isotyp-Kontrolle
- 0,05 M TBS-Waschpuffer
- absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren

- zur Vorbehandlung von Gewebeschnitten: Citratpuffer pH 6, Thermo EDTA-Puffer (pH 8) bzw. TEC-Puffer pH 7,8 oder Enzym
- 3% H₂O₂ (immer frisch ansetzen und dunkel aufbewahren)
- Antikörper-Verdünnungslösung: PBS⁻ + 5% BSA (steril filtrieren nach dem Ansatz)
- Hämalun
- aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren
- organisches Entdeckmittel Entellan
- Blocklösung: 1% FISH Skin (0,1 g), 0,3% Triton X (30 µl), 1% BSA (0,1 g) in PBS⁻ (9970 µl)

Detektionssystem:

EnVision System:

sekundäre Anti-Maus IgG und Anti-Kaninchen IgG mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus- und Kaninchen-AK

Substrat-Chromogen:

AEC+ Substratchromogen (3-Amino-9-Ethylkarbazol)

Alle Chromogene sind licht- und stark temperaturempfindlich und sollten nur so kurz wie möglich auf Zimmertemperatur gebracht werden!

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffiniert und eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden. Werden Zellen auf Chamber Slides oder Cytospots gefärbt, kann nach dem Überführen in Waschpuffer sofort mit dem Schritt Überschichten mit dem Antikörper begonnen werden.

Vorbereitung der Schnitte:

- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle!
- schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 38°C im Wärmeschrank lagern müssen dann nicht mehr in 60°C Wärmeschrank
- in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin sollte geschmolzen sein!)
- direkt in Xylol I überführen

Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
10	Xylol I	absteigende Reihe: Entparaffinieren
10	Xylol II	
2	EtOH 96% I	
2	EtOH 96% II	

2	EtOH 70%	
2	EtOH 50%	
	VE-Wasser	Schwenken

Demaskierung der Epitope (hitzeinduzierte Epitopmaskierung):

- Thermo EDTA-Puffer (pH 8) 1:100 mit VE-Wasser verdünnen bzw. Citratpuffer (pH 6) 1:10 mit VE-Wasser verdünnen oder TEC-Puffer (pH 7,8)
- Demaskierung der Schnitte (100°C vorgewärmt)
- in VE Wasser überführen und mit Fettstift umranden danach in Waschpuffer geben

Demaskierung der Epitope (enzymatische Demaskierung mit Enzymen):

- Schnitte mit Fettstift bzw. Diamantstift umranden
- Enzym auftauen und 50-100 µl auf den Schnitt pipettieren
- Inkubation bei RT
- Waschen mit Waschpuffer

IHC-Vorbereitung

- Herstellung der AK-Verdünnung mit Antikörper-Verdünnungslösung:
- Negativkontrolle: mit IgG, Proteinkonzentration auf gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers einstellen
- Ist die AK-Konzentration unbekannt, erfolgt die Negativkontrolle nur mit der AK-Verdünnungslösung

Blockieren der zelleigenen Peroxidase

(optional, wichtig für Zellen, die endogene Peroxidase besitzen, z.B. Zellen aus dem Blut/Knochenmark):

- mit 3% H₂O₂, 50-100 µl pro Schnitt/Kammer/Spot, 10 min
- Waschen mit Waschpuffer für 5 min

- Evtl. Blocklösung bei Bedarf z.B. Hintergrund
- Überschichten mit 50-100 µl primären Antikörper bzw. IgG-Kontrolle in entsprechender Verdünnung
- Inkubation bei RT für 60 min
- AK-Lösung bzw. IgG-Kontrolle abtropfen
- 3x Waschen mit Waschpuffer

Ab hier im Dunkeln weiterarbeiten!

- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen Polymer-Enhancer
- Inkubation bei RT für 10 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen HRP-Polymer
- Inkubation bei RT für 20 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit AEC Lösung (Lösung ist 1 Woche haltbar)
- Inkubation für 5-7 min
- in Waschpuffer überführen
- Gegenfärbung mit Hämalaun 30-45 sec
- Bläuen in Leitungswasser 60-90 sec
- Überführen in VE Wasser

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/ Bemerkung
2x kurz eintauchen	EtOH 70%	aufsteigende Reihe: Entwässern
2	EtOH 96%	
5	2-Propanol I	
5	2-Propanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	

- Eindecken mit organischem Eindeckmittel (Entellan)
- ü.N. trocknen lassen

4.10 Molekularbiologie

4.10.1 Isolation von RNA

1. Materialien

- RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, 74204)
- Säulchen werden bei 4°C aufbewahrt (Qiagen, im Kit)
- Collection tubes (Qiagen, im Kit)
- Stahlkugeln von Qiagen

- Filterspitzen für RNA (ausschließlich diese benutzen!)
- Reaktionsgefäße: 2 ml und 1 ml
- Skalpell und Klinge
- Petrischale

2. Geräte

- Abzug
- Feinwaage
- Tissue Lyser
- Große Kühlzentrifuge
- Kleine Tischzentrifuge
- Eppendorfpipetten für RNA
- Vortex für RNA
- Tecan infinite M200: Nano Quant

3. Lösungen

- RNase Exitus Plus
- Qiazol Reagenz bei RT (sehr giftig, nur unter dem Abzug arbeiten!)
- Chloroform bei RT (giftig, nur unter dem Abzug arbeiten!)
- 70% und 80% Ethanol (selbst ansetzen, mit RNasefreiem H₂O und EtOH absolut)
- RPE Waschpuffer (Qiagen, im Kit)
- RNasefreies H₂O (Qiagen, im Kit)

4. Vorbereitung

- Stahlkugeln im Becherglas backen, um RNasen zu zerstören (kein autoklavieren!)
- Reaktionsgefäße wie folgt auffüllen: Direkt aus der Verpackung in ein zuvor gebackenes Becherglas schütten
- Arbeitsfläche und Pipettenabwurf mit RNase Exitus Plus reinigen
- Nur beim Öffnen eines neuen RPE Puffers: EtOH absolut zugeben, wieviel steht auf dem Fläschchen

Wichtig:

- Ausschließlich unter dem Abzug arbeiten!
- Ausschließlich mit Handschuhen arbeiten und sämtliche Arbeitsflächen, Materialien, Geräte nur mit Handschuhen anfassen (Gefahr der RNaseverschleppung!)
- Strenge Arbeitsplatztrennung von DNA und RNA, das gilt auch für alle Geräte und alle Materialien!

- Ausschließlich Pipettierhilfen für RNA und Filterspitzen für RNA benutzen!
- Jeglicher fester Abfall, der mit Qiazol in Berührung kam, muss zunächst unter dem Abzug ausdampfen (z. B. über Nacht) bevor man ihn draußen in den Autoklavenbeutel entsorgt.
- Flüssiger Abfall der mit Qiazol in Berührung kam, muss extra gesammelt und entsorgt werden: im Bioreaktorraum, Kanister für halogenhaltige Lösungen
- Am Ende Stahlkugeln mit destilliertem Wasser mehrfach waschen, bis Qiazolreste entfernt sind, zum Backen vorbereiten

5. Durchführung

- Gewebe abwägen und in einem Isolierungsansatz maximal 100 mg einsetzen. Vorzugsweise mit Skalpell in einer Petrischale zerkleinern, besonders bei elastischem bzw. knorpeligem Gewebe.

Grundsatz: 1 ml Qiazol Lysis Reagenz pro 100 mg Gewebe

- Jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß eine (steril gebackene!) Stahlkugel vorlegen
- Gewebe bzw. Gewebestücke in das 2 ml Reaktionsgefäß mit Stahlkugel überführen
- Zunächst 600 µl Qiazol Reagenz (unter dem Abzug!) zum Gewebe hinzufügen (bei insgesamt 1 ml Qiazol Lysis Reagenz und 100 mg Gewebe).
- 2 ml Reaktionsgefäß (austarieren!) in den Tissue Lyser stellen und 3-5 min bei 50 Hz schütteln lassen.

Sollte das Gewebe nicht gut homogenisiert sein, dann Reaktionsgefäß einmal über Kopf mischen und Schüttelvorgang wiederholen.

- Reaktionsgefäß kurz anzentrifugieren und weitere 400 µl Qiazol Reagenz zugeben
- 200 µl Chloroform in das Reaktionsgefäß hinzufügen und ca. 15 sec vortexen bis die Lösung milchig aufschäumt
- Reaktionsgefäß 15 min auf Eis stehen lassen
- Währenddessen die Kühlzentrifuge vorkühlen lassen
- Reaktionsgefäß bei 12000 xg für mindestens 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Dieser Schritt kann zeitlich ausgedehnt werden
- Vorsichtig die wässrige Phase abnehmen, ohne die Interphase auf zu wirbeln und in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 1 Volumen 70% Ethanol zur wässrigen Phase hinzugeben und durch auf- und abpipettieren vermischen
- Gemisch in ein RNeasy MinElute spin column überführen

Maximal 700 µl passen auf die Säule! Bei größerem Volumen, muss der Rest in einem zweiten Schritt in die Säule überführt werden.

- Spin column für 1 min bei 8000 xg (10000 rpm) zentrifugieren
- Collection tube verwerfen, Säule in ein neues collection tube hineinstellen

- 500 µl RPE Puffer in die spin column pipettieren
 - Spin column für 1 min bei 8000 xg (10000 rpm) zentrifugieren
 - Überstand des collection tubes verwerfen und Säulchen wieder in das gleiche collection tube zurückstellen
 - 500 µl 80% EtOH in die Säule geben und 2 min bei 8000 xg (10000 rpm) zentrifugieren
 - Collection tube inklusive Überstand wegwerfen und Säulchen in ein Neues reinstellen
 - Säulchendeckel öffnen (vorher Handschuhe wechseln, Kontaminationsgefahr!) und mit geöffnetem Deckel in die Zentrifuge stellen. Deckel nach innen drehen, ausreichend Abstand zwischen anderen Reaktionsgefäßen lassen und Deckel entgegengesetzt der Zentrifugendrehrichtung drehen.
 - 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
 - Collection tube inklusive Überstand verwerfen und Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß stellen
 - RNasefreies H₂O direkt auf die Membran pipettieren
- Volumen hängt von der zu erwartenden Konzentration ab. Auf Nummer sicher geht man mit 20 µl (10 µl sind das Minimum).
- Säulchen im Reaktionsgefäß in die Zentrifuge so stellen, dass der Deckel des Reaktionsgefäßes nach innen zeigt, der Deckel der Säule ist geschlossen und mit der Öffnung nach innen gedreht.
 - Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min
 - Danach Säulchen verwerfen. Die RNA befindet sich nun im Reaktionsgefäß (= Eluat)
 - Reaktionsgefäß auf Eis stellen für weitere Schritte.
 - Siehe oben unter Wichtig die Entsorgung und Reinigung nach der RNA Isolation.

6. Bemerkungen

- Durch die Säule hat man einen Verlust von 2 µl beim Eluieren
- Direkt im Anschluss kann die cDNA Synthese durchgeführt werden
- RNA wird bei -80°C gelagert.
- Mit dem Nano Drop kann die Konzentration gemessen werden:
Messwellenlänge: 260 und 280 nm Ratio sollte bei 2,0 liegen Einsatzvolumen: 2 µl
- Zusätzlich kann die RNA mit dem Experion qualitativ und auch quantitativ gemessen werden.

4.10.2 cDNA-Synthese

1. Materialien

- Styroporbehälter mit Eis
- Filterspitzen für RNA
- Kleine Reaktionsgefäße (0,2 ml)
- Ständer für RNA

2. Geräte

- Pipetten für RNA
- Thermocycler
- Ggf. Thermoblock
- Tischzentrifuge
- Mini-Tubes Zentrifuge
- Schüttler

3. Lösungen

- RNA zur Transkription (0,5–1 µg)
- RNase-freies Wasser
- Random Hexamere
- Reaction Buffer 5x
- dNTPs 10 mM
- Reverse Transkriptase 200 U/ µl

Achtung:

- Mit Handschuhen arbeiten, Reagenzien und Gebrauchsmaterial nicht ohne Handschuhe anfassen!
- Reverse Transkriptase erst kurz vor Gebrauch aus dem Kühlblock entnehmen!
- Eine Negativkontrolle (statt RNA nimmt man Wasser) mitmachen

4. Durchführung

- Benötigte Lösungen auf Eis auftauen lassen und auf Eis pipettieren
- Am RNA Arbeitsplatz die RNA mit RNase freiem Wasser so verdünnen, dass 0,5-1 µg (möglichst einheitlich für alle Proben) in 11 µl erreicht werden
- Zu den 11 µl je Probe 1 µl Random Hexamere hinzu pipettieren, Probe kurz mischen und zentrifugieren (Endvolumen je Probe 12 µl)
- Die Probe folgendermaßen weiter behandeln: Wahlweise im Thermocycler bzw. Thermoblock

- 5 min bei 70°C
- 5 min auf 4°C
- danach kurz abzentrifugieren
- Während der Inkubationen den Mastermix ansetzen, Reverse Transkriptase erst kurz vor Ablauf hinzugeben!
- Allgemeiner Ansatz für 8 µl Mastermix: (siehe Bemerkungen)
 - 4 µl Reaktion Buffer 5x
 - 1 µl dNTPs 10 mM
 - 2,75 µl RNase freies Wasser
 - 0,25 µl Reverse Transkriptase (200 U/ µl)
- jeweils 8 µl vom Mastermix zu je einer RNA Probe zugeben (Endvolumen: 20 µl)
- Gesamtansatz danach im Thermocycler wie folgt behandeln:
 - 10 min bei 25°C
 - 60 min bei 42°C
 - 10 min bei 72°C
- cDNA danach kurz abzentrifugieren und entweder weiter bearbeiten (siehe Protokoll konventionelle PCR) oder bei -20°C wegfrieren
- cDNA nach Möglichkeit nicht länger als 2 Wochen lagern!

5. Bemerkungen

- Zu Beginn: Arbeitsfläche mit RNase Exitus Plus reinigen (kein Waschethanol verwenden, ist nicht RNase-frei)
- Beim Ansatz des Mastermixes werden bei bis zu 20 Proben mindestens 1 Ansatz, bei bis zu 30 Proben mindestens 2 Ansätze, usw. dazugerechnet.
- Allgemein ist eine strenge Trennung der beiden Arbeitsplätze für RNA und DNA, sowie von Gebrauchsmaterial (wie Filterspitzen, Reaktionsgefäße usw.) aber auch Geräten (wie Pipetierhilfe, Zentrifuge, Schüttler usw.) entscheidend für den Erfolg der PCR!

4.10.3 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde angewendet, um verschiedene Faktoren der cDNA zu amplifizieren und beruht, wie die cDNA-Synthese auf dem Einsatz verschiedener Temperaturen für die drei Schritte der Reaktion, die aus der Denaturierung, der Anlagerung der Primer und deren Extension besteht. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA-Stränge bei einer Temperatur von 94°C.

Im folgenden Schritt wird die Temperatur, die abhängig von der Länge und Nukleotid-Zusammensetzung der Primer ist, gesenkt, um den eingesetzten Primern die Anlagerung an die Matrizenstränge zu ermöglichen. Als Annäherung für die richtige Temperatur lässt sich folgende Formel anwenden, allerdings muss die optimale Temperatur für jedes Primerpaar experimentell festgestellt werden:

$$T_m = 2 * (A + T) + 4 * (G * C) \quad (4.4)$$

Während der dritten Phase wird die Temperatur schließlich auf die optimale Arbeitstemperatur der eingesetzten Polymerase angehoben, die dann ausgehend von den Primern die zur Vorlage komplementären Stränge synthetisiert. Zur PCR wurden in dieser Arbeit standardmäßig Reaktionen mit einem Volumen von 30 µl eingesetzt, die von folgender Zusammensetzung waren 3.5. Diese Ansätze folgten in Thermocyclern den in Tabelle 4.13 dargestellten Temperaturen, um die PCR durchzuführen:

Tabelle 4.13: PCR-Temperaturprotokoll

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl Durchläufe
1)	94°C	3	1x
2)	94°C	30	30 bis 35x
3)	primerspezifische Anlagerungstemperatur	1	30 bis 35x
4)	72°C	1	30 bis 35x
5)	72°C	5	1x
6)	12°C	∞	

Nach Beendigung der PCR können die gewonnenen PCR-Amplifikate entweder direkt elektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20°C gelagert werden.

4.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (1,5% Agarose-Gel) trennt amplifizierte PCR-Produkte elektrophoretisch auf und beruht auf der bei angelegter Spannung entstehenden Abstoßung der durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode und die daraus resultierende Bewegung Richtung Anode. Aufgeschmolzene Agarose bildet aus ihren ursprünglich

linear angeordneten Molekülen Helices, die ein Netzwerk mit Poren der Größe 100 bis 300 nm Durchmesser, abhängig von der Agarosekonzentration, formen. Kurze Nukleinsäuren bewegen sich daher schneller durch das Gel als längere und ermöglichen so die räumliche Auftrennung entsprechend ihrer Größe.

Die Gele wurden in 1x TAE-Puffer aufbereitet und je nach Gelvolumen (50 bzw. 120 ml) mit 4 bzw. 7 μ l Ethidumbromid, das zur Lokalisierung von DNA und RNA in Agarosegelen eingesetzt wird, versetzt. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen von DNA und RNA und ändern dabei ihre Anregungsspektren, sodass dessen Fluoreszenz (590 nm) bei einer Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird. Bereiche im Gel mit DNA erscheinen so intensiv leuchtend.

Die Taschen der Gele wurden jeweils mit 12 μ l der jeweiligen PCR-Amplifikate beladen. Für jedes Gel wurde ein DNA-Größenmarker verwendet, der DNA-Fragmente definierter Größe von 100 bis 3.000 Basenpaaren enthält, die im Verlauf der Elektrophorese ebenfalls aufgetrennt werden und so als Vergleichswert zu den Banden unbekannter Größe dienen.

4.11 Papain-Verdau

1. Materialien

- Schutzbrille
- 500 ml-Messzylinder
- Magnetrührstäbchen, Magnetstab
- Wägeschälchen
- Löffelspatel
- Pulvertrichter
- Becherglas
- Pasteurpipetten

2. Geräte

- Analysenfeinwaage
- Magnetrührer
- Pipettierhilfe
- Abzug
- pH-Meter

3. Chemikalien

- 2,87 g Natriumacetat
- 0,394 g L-Cysteinhydrochlorid
- 4,653 g EDTA-Na₂-Salz x 2 H₂O

4. Lösungen

- 350 ml VE-Wasser
- 5 M NaOH
- PBS⁻
- Papain Enzym (0,56 U/ml)

5. Durchführung

350 ml Papain-Verdau-Puffer, pH 6 bei RT:

- 100 ml VE-Wasser im Messkolben vorlegen, Magnetrührstäbchen vorsichtig zugeben, Messkolben auf den Magnetrührer stellen
- eingewogene Chemikalien der Reihe nach über den Pulvertrichter in den Messkolben geben, rühren
- Chemikalienreste aus Trichter mit weiteren 100 ml VE-Wasser im Messkolben spülen
- Messkolben mit Stopfen verschließen, bis zum vollständigen Lösen rühren lassen
- pH-Elektrode mit VE-Wasser abspülen, so in den Messkolben hängen, dass die Messstelle sich knapp unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befindet
- pH-Wert des Puffers durch (langsame) Zugabe von 5 M NaOH-Lösung auf 6 einstellen
- Messkolben vom Magnetrührer nehmen, Magnetrührstäbchen mit Magnetstab entfernen
- mit VE-Wasser auf 350 ml auffüllen
- Messkolben mit Stopfen verschließen, 2-3x umschwenken, um vollständig zu durchmischen
- Lagerung bei RT

Papain-Verdau:

- Zellkulturmedium absaugen und die Proben mit PBS⁻ spülen
- Proben (Gele, Matrices, BioVaSc[®]) ca. 3h in -80°C einfrieren
- Anschließend in Lyophilisator geben und über Nacht trocknen lassen
- Papain-Verdau-Puffer mit 1% Papain Enzym versetzen
- Getrocknete Proben in 2 ml Reaktionsgefäß geben und mit 1 ml Papain-Verdaulösung bedecken
- Über Nacht bei 60°C inkubieren
- Proben entweder im -20°C sammeln oder gleich vermessen mit GAG bzw. DNA Kit

4.12 DNA Gehaltsbestimmung

1. Materialien

- schwarze Mikrotiterplatte 96-Well
- Reaktionsgefäße
- Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Eppendorfpipetten
- Pipettierhilfe
- Microplate-Reader (Tecan)

3. Lösungen

Im Kit enthalten:

- Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz
- TE-Puffer 20x
- Lambda DNA Stammlösung (100 µg/ml)

4. Durchführung (Beachte die Anmerkungen!)

Vorbereitung:

Lösung	Benötigte Lösungen	Verdünnung
1	TE Puffer 20x	1:20 mit H ₂ O
2	High-Range Lambda-DNA Lösung (4 µg/2 ml) Standardkurve (1 µg/ml–1 ng/ml)	1:50 mit TE Puffer 1x

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz auf RT bringen und zu einem späteren Zeitpunkt verdünnen. Lichtgeschützt aufbewahren!

Standardansatz:

Stocklösung High-Range (1 µg/ml–1 ng/ml) wie folgt ansetzen:

32 µl Lambda DNA Stammlösung (= 100 µg/ml) + 1568 µl TE Puffer 1x = 2000 µl Lambda DNA Standard (= 4 µg/2 ml)

Std	Endkonz [ng/ml]	Stocklösung/Verdünnung [μl]	1x TE Puffer [μl]	Gesamtvolumen [μl]
1	1000	2000 μl DNA-Stocklösung	0	1600
2	800	1600 (von Standard 1)	400	2000
3	600	1500 (von Standard 2)	500	2000
4	500	1600 (von Standard 3)	333	2000
5	400	1667 (von Standard 4)	400	2000
6	300	1600 (von Standard 5)	500	2000
7	200	1500 (von Standard 6)	667	2000
8	100	1333 (von Standard 7)	1000	2000
9	10	1000 (von Standard 8)	1800	2000
10	1	200 (von Standard 9)	1800	2000
11	Blank		300	

Ablauf:

Die angegebenen Standards besitzen noch nicht ihre endgültige Konzentration. Erst nach Zugabe des Quant-iT™ PicoGreen® erhält man die Endkonzentrationen; Das Mischungsverhältnis beträgt 1:2

- Verdünnung der Proben (muss vorher ausgetestet werden!)
- jeweils 100 μl Standard, Blank, Probe (in Duplikaten) in eine 96-Well Platte (schwarz) pipettieren
- Belegung notieren

Benötigte Lösungen	Verdünnung	Pro Well
Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA Reagenz	1:200 mit TE Puffer 1x	100 μl

- je Well 100 μl PicoGreen® Reagenz hinzufügen
- mischen und 2 bis 5 min inkubieren (lichtgeschützt)
- Fluoreszenz messen (Anregung bei 480 nm, Emission bei 525 nm)
- ds DNA-Konzentration der Proben anhand der Standardkurve berechnen, dazu vorher von allen Messwerten den Leerwert subtrahieren und Mittelwerte der Duplikate bilden.

5. Bemerkungen

- Alle Standards und Proben werden in Duplikaten und durch serielles Verdünnen angesetzt.
- Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz lichtgeschützt aufbewahren. - Verdünnung des

Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA Reagenzes in einem Kunststoffbehältnis, da es an Glasoberflächen adsorbieren kann.

- Die ds DNA-Konzentrationen der Proben müssen innerhalb der Standardkurve liegen. Falls dies nicht der Fall ist, müssen die Proben vorher verdünnt werden.
- Um Photobleaching-Effekte zu vermeiden sollte Dauer der Fluoreszenzmessung für alle Proben konstant gehalten werden.

4.13 GAG Gehaltsbestimmung

1. Materialien

- 96-Well Platte
- Reaktionsgefäße
- Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)

2. Geräte

- Pipettierhilfe
- Eppendorfpipetten
- Schüttler
- TECAN Sunrise

3. Lösungen

- Reinstwasser
- aus Kit (Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay):
- Referenz Standard 100 µg/ml
 - Dye Reagenz
 - Dissociation Reagenz

4. Durchführung

- Alle Standards und Proben werden in Duplikaten gemessen
- Zentrifugenröhrchen beschriften
- Standards:
STERIL ansetzen: Angaben jeweils für Doppelbestimmung

Std	GAG [μg]	Standard [μl]	Reinstwasser [μl]	Gesamtvolumen [μl]
Blank	0	0	100	100
1	1	10	90	100
2	2	20	80	100
3	3	30	70	100
4	4	40	60	100
5	5	50	50	100

- Proben:

- Nach dem Papain-Verdau der Proben, diese zentrifugieren (10000 rpm, 10 min) und zwischen 10 und 100 μl vom Überstand verwenden
 - mit Papain-Verdau Puffer auf 100 μl auffüllen
 - Blanks sind 100 μl Papain-Verdau Puffer
- (Wenn kein Vorwissen über den GAG-Gehalt der Proben besteht, sind 50 μl der Probe als Probelauf empfohlen. Die Probe darf nicht mehr als 5 μg GAG enthalten.)
- 1 ml Dye Reagenz zu jedem Zentrifugenröhrchen (Proben, Standards und Blanks) geben und mischen durch invertieren
 - 30 min auf Schüttler stellen
 - Zentrifugieren, 10 min bei 12000 rpm
 - Überstand VORSICHTIG abgießen und werfen. Hängen gebliebene Tropfen durch VORSICHTIGES Klopfen auf Papiertuch entfernen
 - 0,5 ml Dissociation Reagenz in jedes Zentrifugenröhrchen zugeben
 - Vortexen, 10 min stehen lassen (Gebundener Farbstoff muss vollständig gelöst sein! NICHT länger als 2h stehen lassen!!!)
 - 200 μl von jedem Leerwert, Standard, Probe (in Duplikaten) auf eine 96-Well Platte auftragen
 - Belegung notieren
 - Extinktion bei 656 nm messen, Tecan Sunrise
 - S-Glycosaminoglycan-Konzentration mit Hilfe der Standard-Kurve ermitteln. Dazu vorher von allen Messwerten den Leerwert subtrahieren und Mittelwerte der Duplikate bilden.
 - Duplikate sollten +/- 5% um ihren Mittelwert liegen

5. Bemerkungen

- Liegt die Extinktion einer Probe am oberen Ende der Standard-Kurve, sollte die Probe 10fach

verdünnt und die Messung wiederholt werden

- Die Farbstoff-Konzentration reicht nicht für mehr als 5 µg GAG-Moleküle pro Probe.

4.14 Konstruktion eines gewebespezifischen Bioreaktors

Die Umsetzung der Kenntnisse, den Zellcharakter von Chondrozyten *in vitro* zu erhalten oder die chondrogene Differenzierung von Stammzellen zu beeinflussen, erfordert die Konstruktion eines gewebespezifischen Bioreaktors. Dieses System muss Rahmenbedingungen aufrechterhalten, die zum Erhalt der Vitalität und Funktionalität der Zellen beitragen. Neben dem Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts, sowie die Etablierung einer Trägermatrix zur Anregung der Stammzellendifferenzierung erfolgt innerhalb der vorliegenden Arbeit parallel dazu die Entwicklung und Konstruktion eines geeigneten Bioreaktorsystems für das Tissue Engineering von vaskularisiertem Knorpelgewebe. Dieses Kapitel stellt anhand einer gewebespezifischen Bioreaktor-anwendung zusammenfassend die Arbeiten auf dem Gebiet der Reaktorentwicklung dar.

Zur Kultivierung von 3D Konstrukten *in vitro* gewinnt der Bioreaktor im Tissue Engineering zunehmend an Bedeutung. Mit dem Aufbau großer 3D Gewebekonstrukte, der Ko-Kultivierung unterschiedlicher Zelltypen und dem wachsendem Wissen über die vom Reaktor zu liefernden Signale auf Zelldifferenzierung steigt auch die Komplexität der Bioreaktorsysteme. Gleichzeitig müssen die Bioreaktoren im Laboralltag, sowie beispielsweise hinsichtlich der Verwendung bei Substanz-Screenings gut handhabbar sein (Hansmann, 2010). An dem hier vorgestellten Prozess, der Entwicklung eines Bioreaktors zum Aufbau von vaskularisierten 3D Geweben, lässt sich das Entstehen solch eines Systems und die Bedeutung dieser Technologie für das Tissue Engineering beispielhaft zeigen. Zudem werden auch die einzuhaltenden Anforderungen und deren Auswirkungen auf den Aufbau deutlich. Dabei kann am gezeigten Beispiel der komplette Vorgang von der Planung und der Konstruktion bis hin zur Fertigung nachverfolgt werden.

Mit Hilfe des Konstruktionsprogramms SolidWorks wird zunächst ein 3D Bioreaktormodell konstruiert, dabei erfolgt die Konstruktion einer Bauteilgruppe, die aus einzelnen Bauteilen besteht. Anschließend werden Konstruktionszeichnungen der benötigten Bauteile angefertigt, um diese von einer Werkstatt (GT-Labortechnik, Würzburg (D)) fertigen lassen zu können. Nachfolgende Tabelle zeigt die Stückliste der Bauteile, aus denen das Bioreaktorsystem besteht.

Tabelle 4.18: Materialanforderung und Stückliste für die Fertigung des Bioreaktors.

Pos.	Menge [Stk]	Benennung	Sachnummer/Norm-Kurzbezeichnung	Bemerkung
1	1	Magnetadapter	1	Magnetischer Werkstoff, Ferrit
2	1	Welle	2	V4A
3	1	Hülle	3	PEEK
4	1	Verfahrtisch unten	4	PEEK
5	1	Verfahrtisch oben BioVaSc®	5	PEEK
6	1	Frontplatte	6	PC
7	1	Mörser	7	PEEK
8	1	Stempel	8	V4A

Eine Skizze des Bioreaktormodells im Zusammenbau mit allen Bauteilen ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Bauteile sind mit ihrer Sachnummer nummeriert.

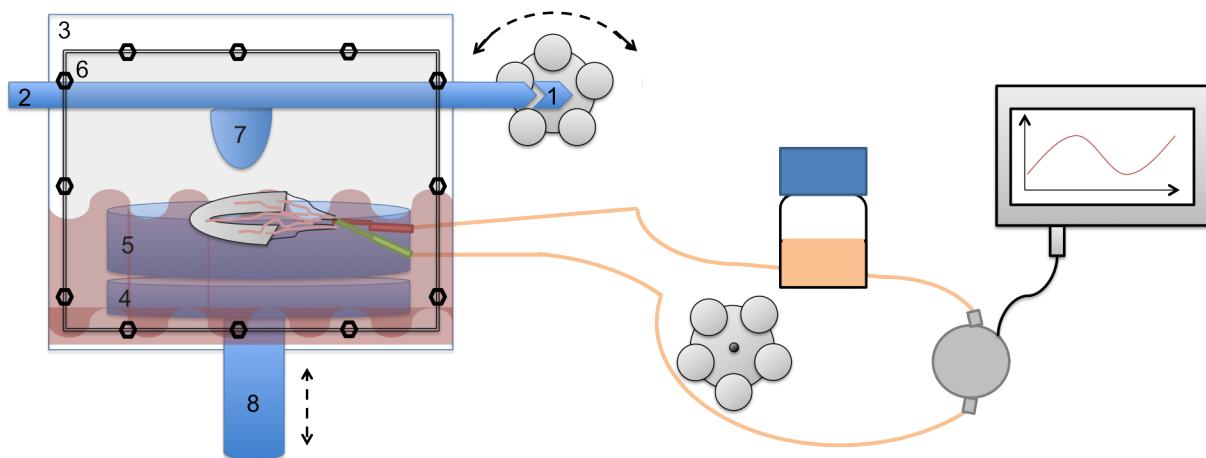


Abbildung 4.6: Skizze des Bioreaktormodells mit allen Bauteilen als Zusammenbau dargestellt.

Bioreaktoren, die ihren Einsatz in der Zellkultur finden, müssen ein abgeschlossenes und fluid-dichtes System sein, wobei ein steriler Gasaustausch, der über einen Luftfilter zum Abhalten von Keimen realisiert werden kann, lebensnotwendig ist. Eine weitere Anforderung von Bioreaktorsystemen ist die unabdingbare Möglichkeit des Flüssigkeitsaustauschs. Zellen benötigen für ihr Wachstum Nährstoffe, die sie *in vitro* aus Zellkulturmedien entnehmen, in denen sie kultiviert werden. Jedoch findet auch die Abgabe von Stoffwechselprodukten und Abfallstoffen

der Zellen in das Medium statt. Ebenso Wachstumsfaktoren in Differenzierungsmedien sind nicht langzeitstabil und müssen frisch zum Erhalt der Zelldifferenzierung ins Medium zugegeben werden. Eine weitere Anforderung auf Grund der Kosten ist, das Volumen des benötigten Mediums im System möglichst gering zu halten. Es wird weiter darauf geachtet, dass das zu entwickelnde System in den bereits bestehenden Inkubatorschrank integriert werden kann und somit die Außenmaße festgelegt sind. Der Inkubatorschrank ist mit einer Rollerpumpe sowie mit einem Drucksensor ausgestattet, an diesen das System angeschlossen werden soll. Die Umgebungsbedingungen in diesem Schrank betragen 37°C und 5% CO₂. Dementsprechend erfolgt die Auswahl der Materialien, aus welchem der Bioreaktor gefertigt wird. Dabei ist zu beachten, dass sie rostfrei und für die vorher genannten Umgebungsbedingungen ausgelegt sind. Die Materialien im Innenraum haben zusätzlich den Anspruch, autoklavierbar und biokompatibel zu sein, da sie mit biologischem Zell- und Biomaterial in Kontakt treten. Die Sterilisation des Reaktors erfolgt mittels Dampf, wobei das Autoklavieren im Vergleich zur γ -Sterilisation oder Ethylenoxid-Begasung (EO) eine einfache und unbedenkliche Methode darstellt, Materialien von Keimen zu befreien. Jedoch erfordert diese Methode eine Temperaturbeständigkeit der verwendeten Materialien bis 121°C und es muss auf geeignete Materialpaarungen geachtet werden, um eine Beschädigung durch Wärmeausdehnungen zu vermeiden. Ein Verhindern der Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse durch die Schädigung der zellbesiedelten Konstrukte, hervorgerufen durch das Reaktormaterial, setzt die Biokompatibilität des Materials voraus. Kunststoffe wie Polyvinylidenfluorid (PVDF) und Polyetheretherketon (PEEK), sowie ein nichtrostender V4A Edelstahl dienen als Werkstoffe zum Aufbau des Bioreaktorsystems. Für die Fertigung durchsichtiger Bauteile, wie beispielsweise die Frontplatte wird Polycarbonat (PC) eingesetzt. Zum Verbinden der Reaktorteile und für den Anschluss an die Rollerpumpen werden Silikonschläuche verwendet. Ein dichtes Verschließen von Anschlüssen wird durch Teflon- oder Silikondichtungen realisiert. Eine weiterer Anspruch an das System ist die einfache Handhabung, was zur Vermeidung von Kontaminationen beiträgt. Diese beinhaltet das unkomplizierte Öffnen des Bioreaktors und Entnehmen von Proben und der Zusammenbau aus wenigen handhabbaren Teilen. Das Lastenheft des gewebespezifischen Bioreaktors sieht wie folgt aus:

1. Abgeschlossenes System
2. Sicherstellung der Sterilität während des Gewebeaufbaus
3. nicht luftdicht, Gasaustausch
4. fluiddicht
5. Flüssigkeitsaustausch/Medienwechsel während des Betriebs muss möglich sein
6. *Optional*: Medienwechsel automatisierbar gestalten
7. *Optional*: Wachstumsfaktoren im Medium automatisiert zugeben ins Medium
8. Geringes zu verwendendes Medienvolumen

9. Ausgelegt für Inkubatorschrankatmosphäre (37°C, 5% CO₂)
10. Maximale Außenmaße
 - im Brutschrank 250x150x500 mm (BxHxT)
 - im Inkubatorschrank 300x250x400 mm (BxHxT)
11. Materialien
 - Innenraum (Kontaktraum mit Zellen/Konstrukt) mit Welle: lebensmittelecht, biokompatibel, autoklavierbar, UV-undurchlässig
 - Außenraum: rostfrei, sprühsterilisierbar, ausgelegt für 37°C und 5% CO₂
12. Modularer Aufbau
 - abkoppelbarer sterilisierbarer Innenraum mit Konstrukthalterung
 - Außenraum mit Steuerungen
 - Aufbau durch modulare Konstrukthalterungen erweiterbar
13. Es soll ein Konstrukt im Reaktor belastet werden (*Optional*: mehrere Konstrukte)
 - Steuer- und regelbare Druckkraft (vergleichbare Werte mit *in vivo* Situation)
 - Steuer- und regelbare Scherkraft (vergleichbare Werte mit *in vivo* Situation)
14. Sicherstellung eines pulsatilen Flussprofils
 - Anschluss an den arteriellen Zugang
 - Druck von 120/80 mmHg innerhalb der Gefäßstrukturen

Neben den zellkulturbedingten und grundlegenden Voraussetzungen wie Autoklavierbarkeit, Biokompatibilität und die einfache Handhabung der Anlage, existieren für die Entwicklung des Bioreaktors zwei weitere anwendungsbedingte Anforderungen für die Kultivierung von vaskularisiertem Meniskusgewebe. So zum einen die Kultivierung von zellbeladenen Biomaterialien unter definierten Druck- und Scherkräften. Hierbei ist das 3D Biomaterial mit einem Zelltyp besiedelt. Neben diesem einfachen Aufbau muss das Konstrukt mit mehreren Zelltypen aufgebaut werden, um ein vaskularisiertes System zu erhalten. Dabei ist die Gewährleistung des pulsatilen Flusses für die Endothelzellen von wichtiger Bedeutung. Dies bedingt den Anschluss eines getrennten Perfusionsweges an den arteriellen Zugang des Gefäßsystems.

Neben dem Einsatz der mit Hydrogel gefüllten BioVaSc[®]-Matrix, soll der Bioreaktor auch für andere Trägerstrukturen eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konstruktbeispiele mit unterschiedlichen Geometrien, Formen und Größen sind die beiden Folgenden:

- Eine mit Hydrogel gefüllte BioVaSc[®]: mondförmig, Halbkreis mit ca. 60 mm Durchmesser, 20 mm Stärke und 10 mm Höhe
- Kollagen Typ I Hydrogel: 2 ml Volumen, 10x5x20 mm (BxHxT)

Im Kniegelenk herrschen Druck-, Zug- und Scherkräfte neben Roll-/ Gleitbewegungen auf den Meniskus, die im zu entwickelnden Bioreaktor integriert und auf das *in vitro* aufgebaute 3D Konstrukt in Mono- und Ko-Kultur übertragen werden sollen. Dazu wird ein modular aus-

tauschbares Bauteil, der obere Verfahrtsch bzw. Probenstisch geplant. Ein Probenstisch wird für die Kultivierung der zellbesiedelten Biomaterialien mit nur einem Zelltyp verwendet. Ein zweiter spezifischer Probenstisch wird konstruiert, dessen Verwendung für die Kultivierung des 3D Ko-Kulturmodells, welches die BioVaSc[®] integriert, erfolgt. Der jeweilige Probenstisch sitzt auf einem unteren Verfahrtsch auf, der wiederum an einen Stempel aufgeschraubt ist. Dieser ist mit einer Dichtung nach außen abgedichtet, und wird von einem Kompaktzylinder, der im Außenraum unterhalb des mechanischen Bioreaktorsystems angebracht ist über ein pneumatisches System angetrieben. Ein Mörser, der an einer Welle über dem Probenstisch befestigt ist, übt durch eine alternierende Roll-/ Gleitbewegung von etwa 30° eine Scherung auf das Biomaterial bzw. Konstrukt aus, wodurch die Bewegung des Kniegelenks sowie die Kraftübertragung auf die Menisken nachgeahmt wird. Der Antrieb der Welle wird außerhalb der Kulturkammer, über die Ankopplung an die Rollerpumpe mit Hilfe eines Magnetadapter realisiert. Die Eingabe der alternierenden Bewegungen erfolgt über die programmierbare mikroprozessorbasierte Steuerung der Pumpen. Die Kulturkammer, auch Hülle genannt, stellt den sterilen Innenraum des Bioreaktors dar, in diesem die Proben kultiviert werden. Folglich ist die Hülle gegen Kulturmedium abzudichten. Zur Betrachtung der Bewegungen auf das Konstrukt von außen, wird eine durchsichtige Frontplatte gewählt, die den Innenraum abschließt und mit einem O-Ring aus Silikon ringsum abdichtet.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von nativem Meniskusgewebe

Als Referenz wurde natives Meniskusgewebe (human und porcine) herangezogen und histologische sowie immunhistologische Analysen durchgeführt. Das native Gewebe wurde fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend 5 μm dünne Paraffinschnitte angefertigt. Aufgrund der zonalen Aufteilung des Meniskus, erfolgte zur Übersicht die Aufnahme von vier unterschiedlichen Bereichen des Gewebes, die in den Abbildungen 5.1 bis 5.4 zusammengestellt sind. Hierzu wurden Bereiche aus dem äußersten Drittel aufgenommen, die den Bildern der ersten Zeile entsprechen. Im mittleren Drittel erfolgten jeweils zwei Aufnahmen von oben und unten, die in der 2. und 3. Zeile zu sehen sind, sowie aus dem innersten Bereich, dazu die Bilder der letzten Zeile. In den Abbildungen 5.1 und 5.3 sind die Aufnahmen eines humanen nativen Meniskus zu sehen, in Abbildung 5.2 und 5.4, die eines porcinen. Gefärbt wurden Übersichtsfärbungen mit HE und Movat-Pentachrom Färbung, die jeweils in der ersten Spalte der Abbildungen zu sehen sind. Weiter erfolgten immunhistologische Färbungen unterschiedlicher Proteine. In Abbildung 5.1 und 5.2 sind endothelzellspezifische Marker, wie vWF (B,F,J,N), CD31 (C,G,K) sowie VEGF (D,H,L,P) zusammengestellt. In Abbildung 5.3 und 5.4 hingegen sind ausgewählte knorpelspezifische Marker dargestellt. Bild (B,G,L,Q) zeigen die Färbungen von Aggrecan, Bild (C,H,M,R) die von Kol Typ I, (D,I,N,S) die von Kol Typ II und (E,J,O,T) von Kol Typ X. Die Färbungen der zugehörigen Isotypen zeigten bei allen gefärbten Antikörpern keine positive Expression (nicht dargestellt).

Die Zellverteilung im Meniskusgewebe, sowohl human als auch porcine, fällt abhängig vom Bereich unterschiedlich aus. Im äußersten und inneren Drittel befinden sich mehr Zellen als im mittleren Drittel, wobei am äußersten Rand Zellen, wie EZ und Bindegewebszellen vorkommen, und MZ im mittleren Bereich wenige, hingegen im Inneren mehr im Gewebe vorliegen.

Die Verteilung der MZ, einzeln oder in kleinen Gruppen in der Matrix zu liegen, ist typisch für Chondrozyten.

Der vWF ist ein Glykoprotein, welches in Endothelzellen gebildet und in diesen gespeichert wird. Ebenso ist CD31 ein zellspezifischer Marker für Endothelzellen. Im Meniskus lassen sich nur im äußersten Drittel VWF und CD31 positive Zellen beobachten, dies ist bedingt dadurch, dass das Gewebe nur teilvaskularisiert ist. Im mittleren und innersten Drittel des Gewebes ist keine positive Färbung der beiden Marker festzustellen. Dieses Beobachtungsmuster ist in beiden Spezies identisch.

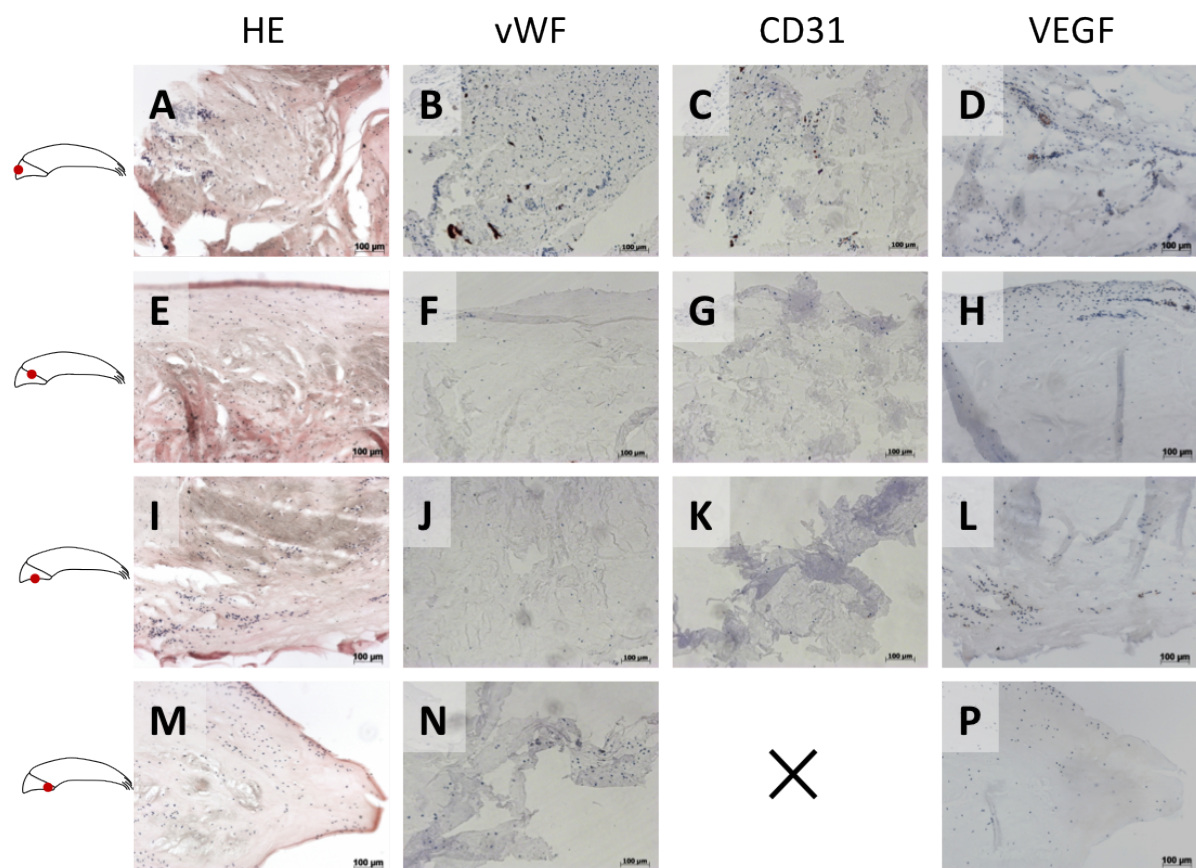


Abbildung 5.1: Färbungen eines humanen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-D) stellt den äußersten Bereich dar, (E-H) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (I-L) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (M-P) das innerste Drittel. (A,E,I,M) zeigt die HE Färbung. Eine positive Färbung von vWF (B,F,J,N) und CD31 (C,G,K) ist ausschließlich im äußeren Bereich zu finden. VEGF (D,H,L,P) färbt Zellen positiv im äußersten Bereich und am Rand an. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung).

Anders hingegen ist das Expressionsmuster des Faktors VEGF. Während beim humanen Meniskus VEGF positive Zellen im äußeren Bereich und am Rand der Mitte des Gewebes zu finden sind, sind beim porcinen Meniskus auch Zellen im innersten Bereich gefärbt. VEGF ist ein wichtiges Signalmolekül, das sowohl in der Vaskulogenese, als auch in der Angiogenese seine Wirkung entfaltet. Wie der Name bereits impliziert, stimuliert dieser Faktor hauptsächlich vasculäres Endothel.

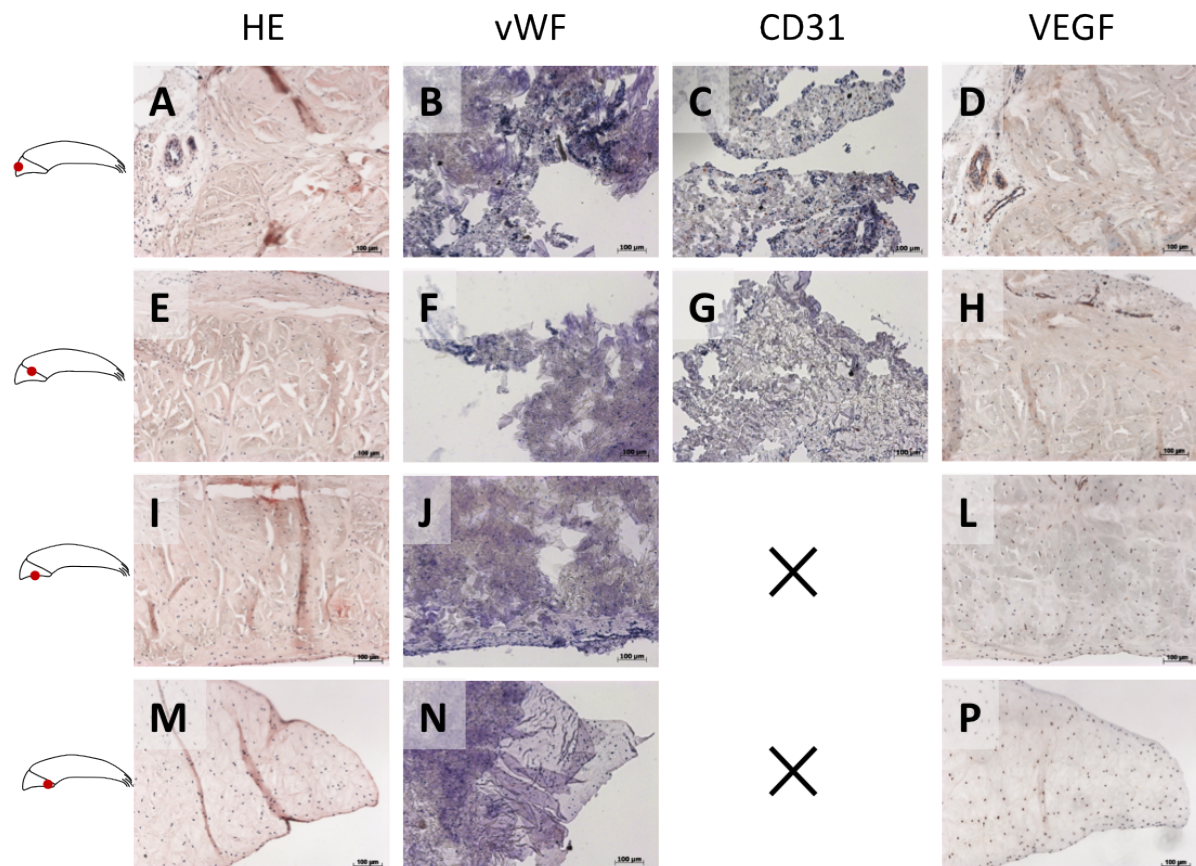


Abbildung 5.2: Färbungen eines porcinen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-D) stellt den äußersten Bereich dar, (E-H) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (I-L) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (M-P) das innerste Drittel. (A,E,I,M) zeigt die HE Färbung. Eine positive Färbung von vWF (B,F,J,N) und CD31 (C,G,K) ist ausschließlich im äußeren Bereich zu finden. VEGF (D,H,L,P) färbt Zellen positiv im äußersten und innersten Bereich sowie am Rand an. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung).

Neben den Färbungen der humanen und porcinen Meniskusgewebe mit endothelzellspezifischen Markern sind im Folgenden die Färbungen mit knorpelspezifischen Markern zusammengestellt. In der Pentachrom Färbung stellt sich Bindegewebe rötlich dar, was beim Meniskus ausschließlich im äußeren, vaskularisierten Bereich zu beobachten ist. In diesem Bereich sind, wie schon bei der HE Färbung zu erkennen war die meisten Zellkerne vorhanden. Am äußeren Rand und im innersten Bereich des Meniskus können nicht-mineralisierte knorpelige Bereiche, in blau dargestellt, beobachtet werden. Der mittlere Bereich des Meniskus besteht aus noch nicht vollständig verknöchertem Geflechtknorpel, in der Pentachrom Färbung sind diese Flächen gelb angefärbt. Diese Beobachtungen erfolgten im humanen sowie im porcinen Gewebe.

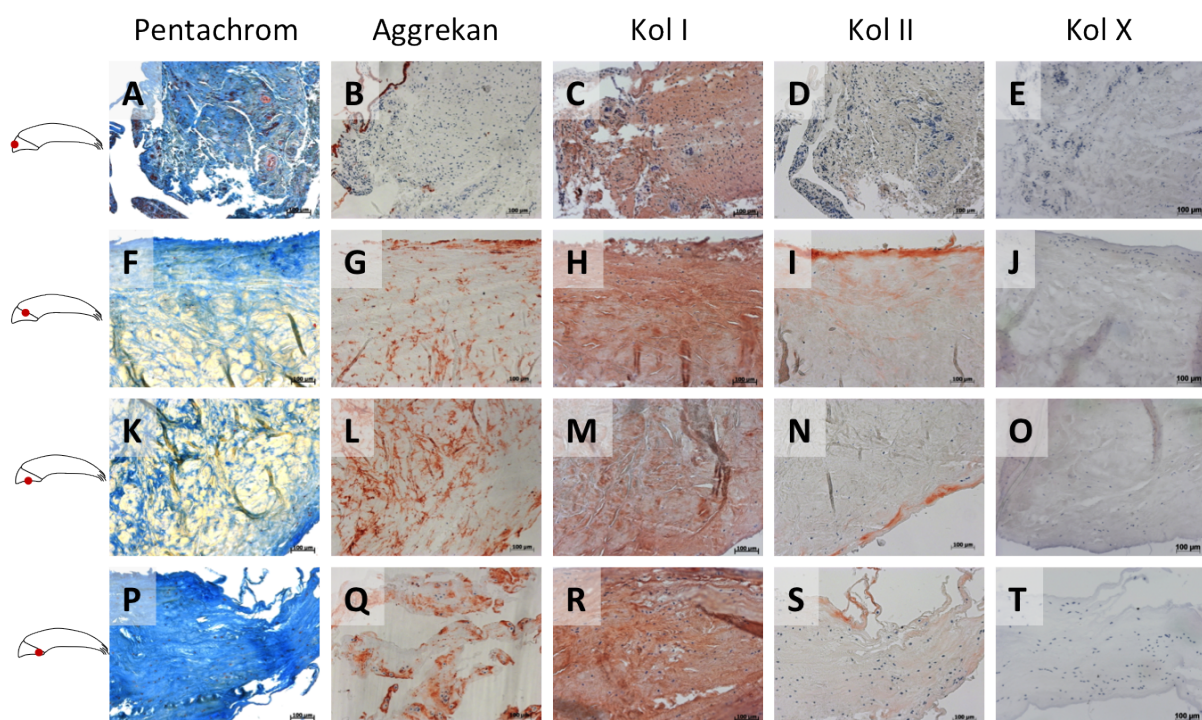


Abbildung 5.3: Färbungen eines humanen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-E) stellt den äußersten Bereich dar, (F-J) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (K-O) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (P-T) das innerste Drittel. (A,F,K,P) zeigt die Pentachrom Färbung, (B,G,L,Q) die immunhistologische Färbung von Aggrekan, (C,H,M,R) von Kol I, (D,I,N,S) von Kol II und (E,J,O,T) die von Kol X. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung).

Die immunhistologische Färbung des Markers Aggrekan färbt dieselben knorpeligen Strukturen an, wie schon die Blaufärbung der Pentachrom Färbung gezeigt hat. Im mittleren und innersten

Bereich ist eine positive Färbung von Aggrekan zu sehen, sowohl beim humanen als auch beim porcinen Gewebe, wobei der äußerste Bereich nicht gefärbt ist. Die Färbung von Kol I zeigt eine deutliche Rotfärbung des ganzen humanen Gewebes, hingegen das porcine Meniskusgewebe im äußeren Bereich nicht gefärbt ist. Kol II wird am Rand des humanen Meniskus schwach exprimiert und zeigt beim porcinen Meniskus keinerlei positive Expression. Eine positive Kol X Expression ist in der Mitte beim humanen Meniskus zu beobachten, während beim porcinen Gewebe zusätzlich der innere Bereich gefärbt ist.

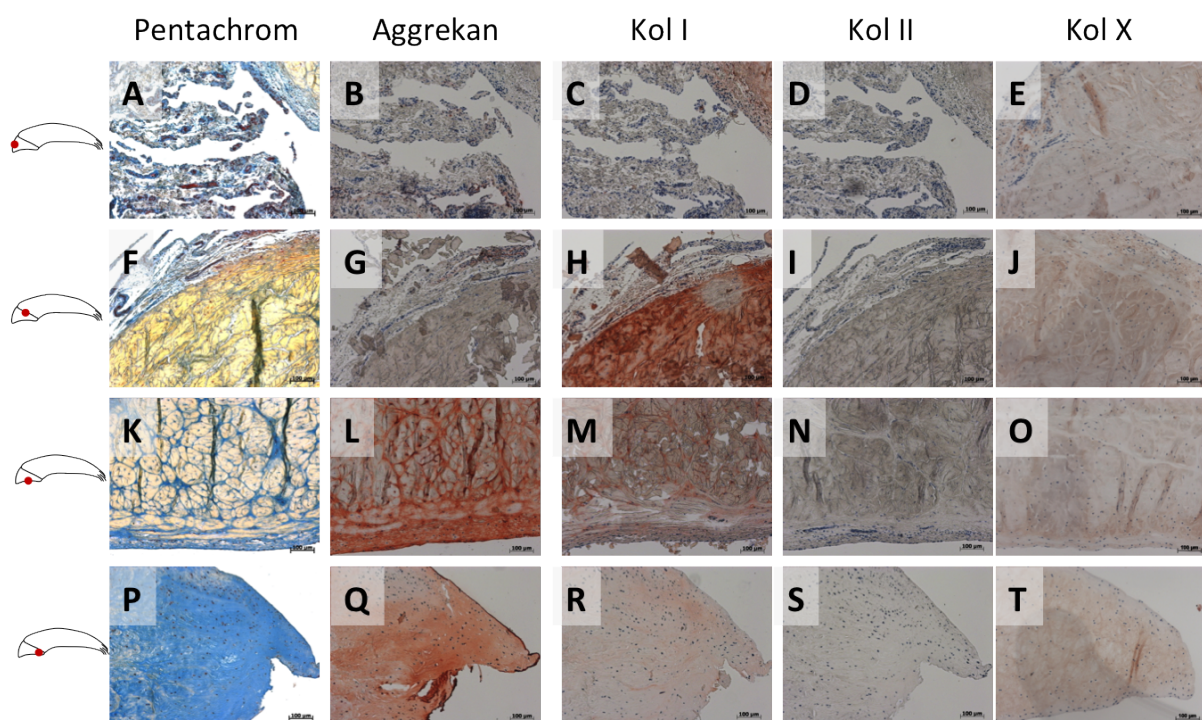


Abbildung 5.4: Färbungen eines porcinen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-E) stellt den äußersten Bereich dar, (F-J) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (K-O) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (P-T) das innerste Drittel. (A,F,K,P) zeigt die Pentachrom Färbung, (B,G,L,Q) die immunhistologische Färbung von Aggrekan, (C,H,M,R) von Kol I, (D,I,N,S) von Kol II und (E,J,O,T) die von Kol X. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung).

Zusammengefasst ist der Meniskus ein sehr dichtes Knorpelmischgewebe, hauptsächlich bestehend aus Aggrekan und Kol I und X. Das Vorkommen von Kol II ist sehr gering. Der innerste Bereich besitzt eine nicht-mineralisierte Knorpelstruktur und im mittleren Drittel weist der Meniskus eine mineralisierte Knorpelmatrix auf. Das äußere Meniskusdrittel ist vaskularisiert

und mit Bindegewebe versehen. Zwischen dem humanen und porcinen Gewebe gibt es geringe Unterscheidungen der Markerexpressionen.

5.2 Aufbau von Ko-Kultursystemen mit Primärzellen

Zu Beginn der Experimente erfolgte die Charakterisierung der isolierten Zelltypen sowie Vorversuche, die zwei Zelltypen zunächst auf einer 2D PET Membran und einer 2D kollagenbasierten Trägermatrix, der CCC zu kultivieren. Die Kultivierung erfolgte dabei statisch in Zellkronen.

5.2.1 Charakterisierung der verwendeten Zelltypen

Nach der erfolgreichen Isolation der Zellen aus dem Gewebe erfolgt die Kultivierung *in vitro* in Zellkulturflaschen, an deren Kulturoberfläche sich die primären Zellen adhären und Cluster ausbilden. Diese aus teilungsfähigen Zellen bestehenden Cluster vergrößern sich, so dass schließlich nach 10 bis 14 Tagen ein konfluenter Monolayer entsteht. Humane und porcine mvEZ adhären bereits wenige Stunden nach der Aussaat und setzen ihr Wachstum in kleinen Kolonien fort (Abbildung 5.5 (A),(B)). Über die Kultivierungsdauer vergrößern sich die Kolonien stetig, bis sich eine homogene Zellschicht bildet (Abbildung 5.5 (C),(D)). Morphologisch stellen sich die mvEZ als flache Zellen mit ovalem Zellkern im Zentrum dar, die sich pflastersteinförmig anordnen. Porcine mvEZ erscheinen dabei etwas kleiner als humane Zellen und bilden eine dichtere Monolage.

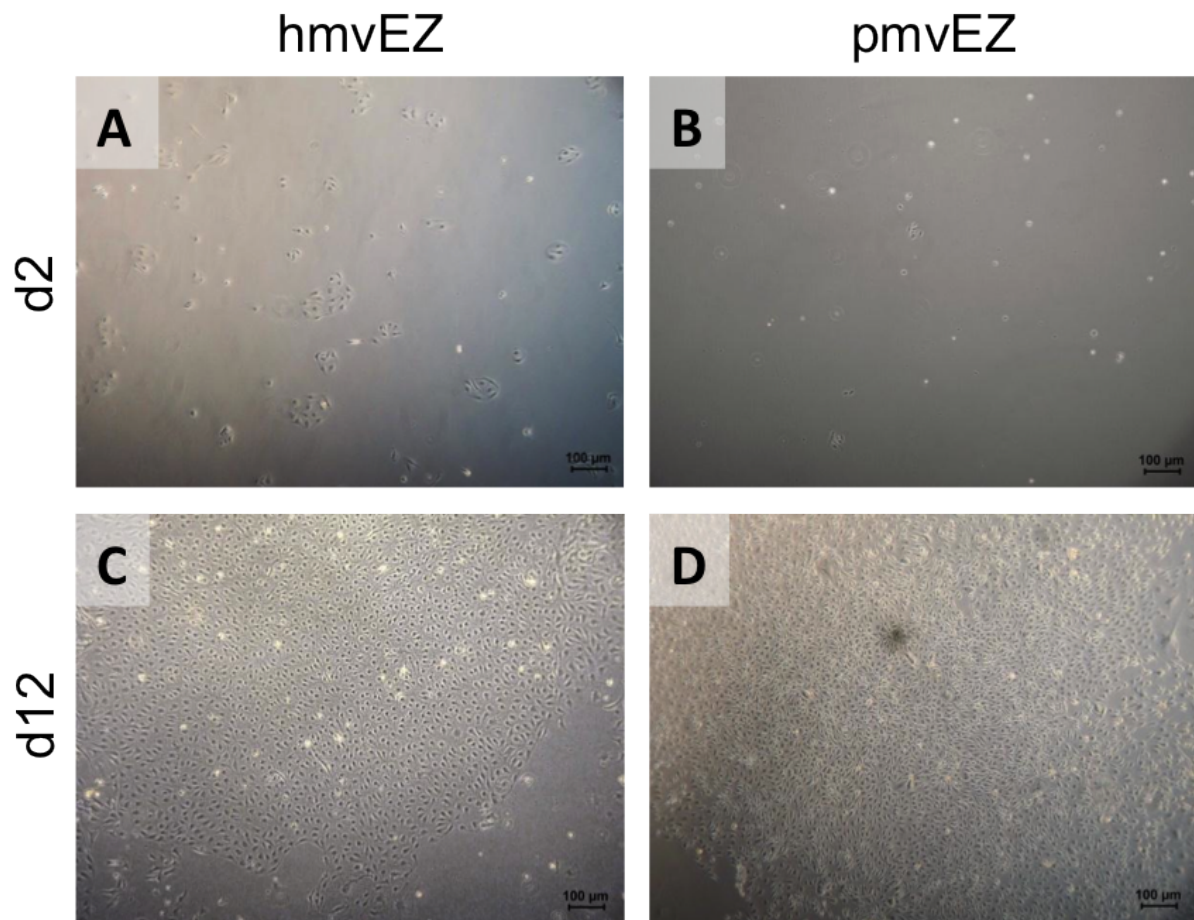


Abbildung 5.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen und porcinen mvEZ. Zellen an Tag 2 (A),(B) und Tag 12 (C),(D) nach der Isolation (Passage 0).

Die primären MZ zeigen eine spindelförmige Morphologie auf, die Fibroblasten sehr ähnelt (Abbildung 5.6). Während die mvEZ bei der Isolation aus der Dermis herausgestrichen wurden, erfolgte bei der Isolation der MZ ein Anverdauen der Meniskusgewebestücke, aus denen es den Zellen in den ersten Tagen der Kultur gelang, herauszuwachsen und sich an der Kulturoberfläche der Flaschen zu adhären. Während der ersten Tage in Kultur waren die Zellen zunächst vereinzelt aufzufinden und ihre Wachstumsgeschwindigkeit gering, die nach ca. einer Woche zunahm, bis nach 2 Wochen eine 80%ige Konfluenz erreicht war. Es wurde nicht zwischen den einzelnen Meniskusgewebeschichten unterschieden. Mit fortschreitender Kulturdauer erschienen porcine MZ (Abbildung 5.6 (D)) größer als die humanen MZ und wiesen eine rundlichere Morphologie auf.

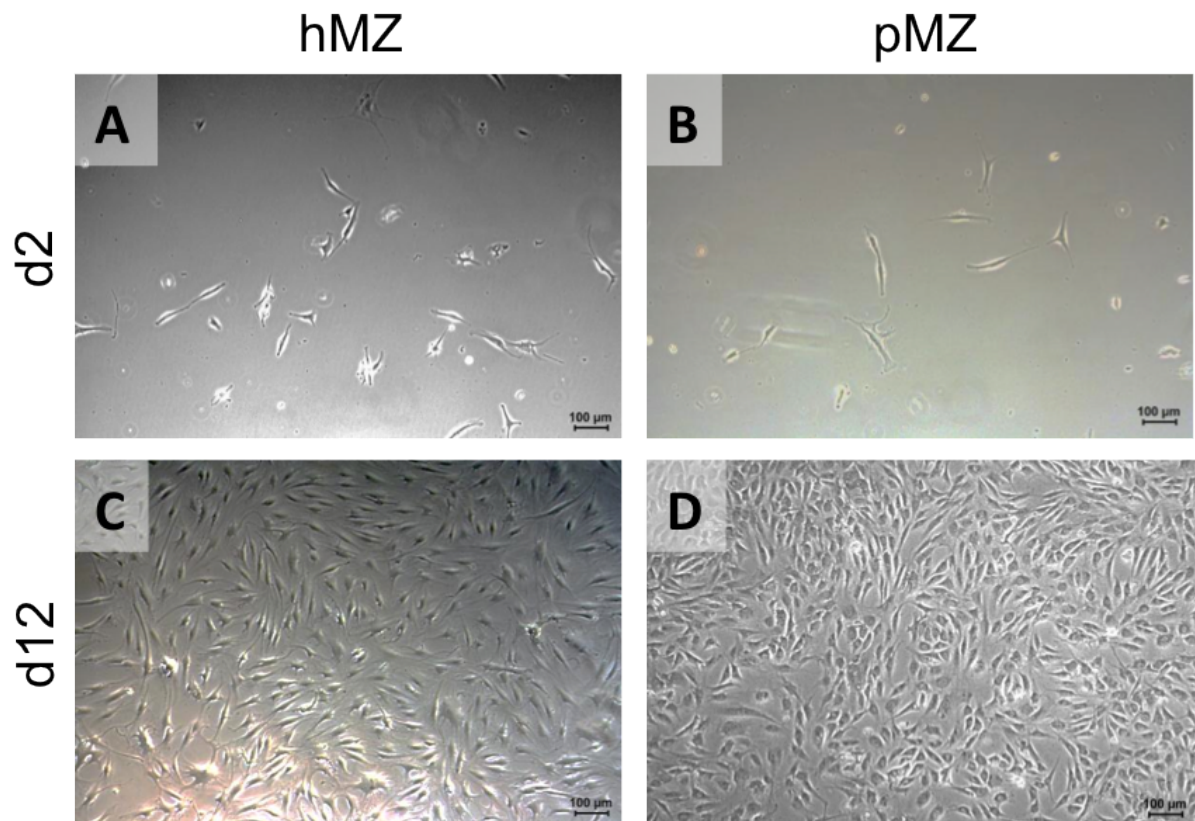


Abbildung 5.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen und porcinen MZ. Zellen an Tag 2 (A),(B) und Tag 12 (C),(D) nach der Isolation (Passage 0).

5.2.2 Synthetisches 2D Ko-Kulturmodell auf einer PET Membran

In Vorversuchen für die Ko-Kulturmodelle wurde zunächst eine synthetische Membran als Trägerstruktur für die Zellen verwendet. Die Zellen wurden getrennt voneinander auf beiden Seiten der Membran ausgesät und vor den Färbungen mit einer Trypsinbehandlung von der Membran abgelöst und als Cytospots auf Objektträger mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge aufgetragen. Neben den Ko-Kulturmodellen von hMZ mit hmvEZ erfolgten gleichzeitig Mono-Kulturen der hMZ als Kontrolle. Die hMZ, die aus den Mono-Kulturansätzen kamen, exprimierten stark die Faktoren RunX2, Sox9 und vor allem VEGF. Diese Marker konnten auch in den Ko-Kulturansätzen der hMZ mit hmvEZ beobachtet werden, jedoch mit einer geringeren Intensität. Eine Kol X Expression der Zellen konnte sowohl in der Mono- als auch in der Ko-Kultur nicht nachgewiesen werden. Die Färbungen der Cytospots sind in Abbildung 5.7 (A)

bis (H) gezeigt. Die Isotypkontrollen zeigten keine positive Färbung.

Der Aufbau des 2D Ko-Kulturmodells erfolgte mit zwei biologisch unabhängigen Replikaten, wobei für beide Spender dasselbe Expressionsmuster beobachtet werden konnte.

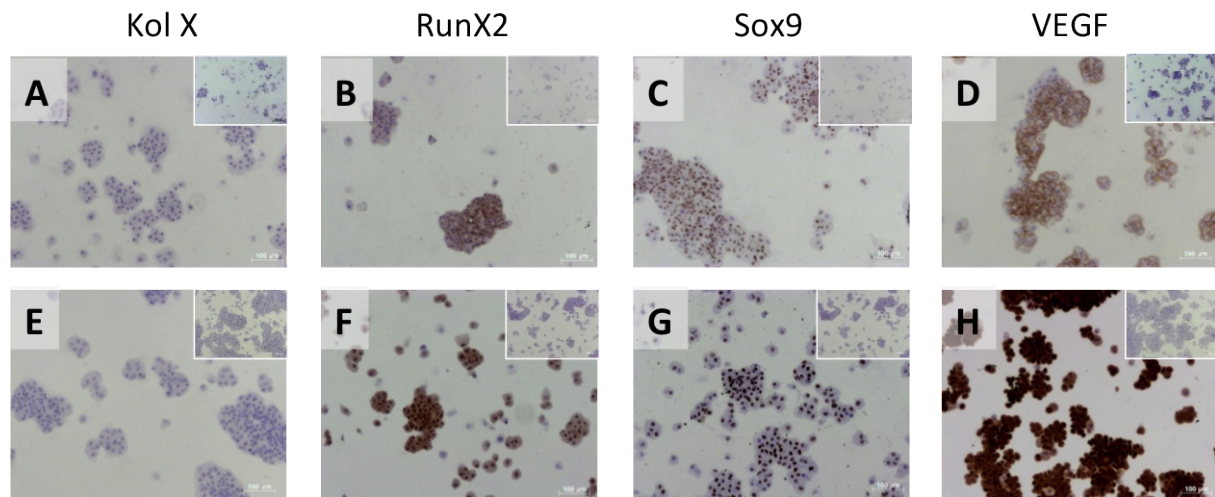


Abbildung 5.7: Immunhistochemische Charakterisierung der hMZ auf Cytospots aus Ko-Kultur mit hmVEZ (A-D) und Mono-Kultur (E-H) auf PET Membranen. Die Isotypkontrollen sind in jeder rechten oberen Bildecke zu sehen. (blau=Gegenfärbung; braun=spezifische Antikörpermarkierung).

5.2.3 Natürliches 2D Ko-Kulturmodell auf einem kollagenbasierten Zellträger

Für eine natürlichere Zellumgebung erfolgten weitere 2D Versuche auf einem kollagenbasierten Zellträger, der Collagen Cell Carrier (CCC), auf diesem hMZ mit hmVEZ ko-kultiviert und hMZ mono-kultiviert wurden. Neben einer unspezifischen Färbung ausgehend der CCC Matrix, wurden keine Kol X positiven Zellen detektiert. Der Transkriptionsfaktor RunX2 war in beiden Kultursystemen mit vergleichbarer Intensität nachweisbar. Im Ko-Kulturmodell waren nur wenige Sox9-positive Zellen zu beobachten, während im Mono-Kulturmodell keine Sox9 positiven Zellen nachweisbar waren. VEGF wurde in beiden Kulturen exprimiert, wobei ein stärkeres Signal in der Mono-Kultur detektierbar war. Die immunhistologischen Färbungen der besiedelten CCC Matrices sind in Abbildung 5.8 zusammengefasst.

Der Aufbau dieses Ko-Kulturmodells erfolgte ebenfalls mit zwei biologisch unabhängigen Replikaten, wobei für beide Spender dasselbe Expressionsmuster beobachtet werden konnte.

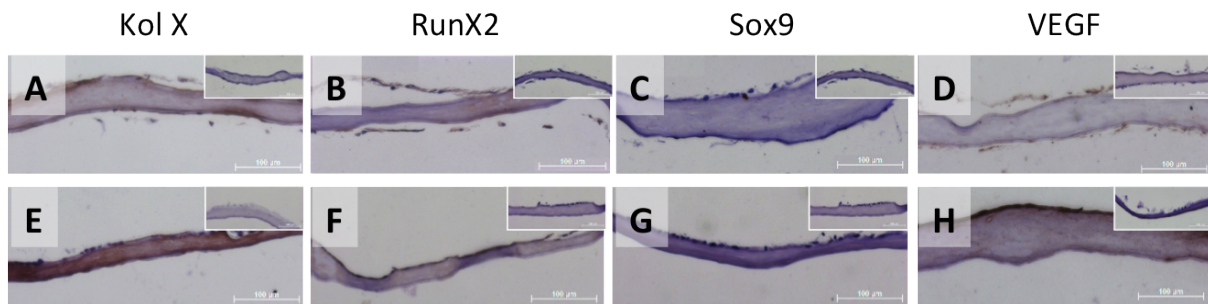


Abbildung 5.8: Immunhistochemische Charakterisierung der hMZ aus Ko-Kultur mit hmvEZ (A-D) und Mono-Kultur (E-H) auf CCC Trägermatrices. Die Isotypkontrollen sind in jeder rechten oberen Bildecke zu sehen. (blau=Gegenfärbung; braun=spezifische Antikörpermarkierung).

Zusammenfassend sind in Tabelle 5.1 die Expressionen der untersuchten Marker der unterschiedlichen experimentellen Systeme im Vergleich dargestellt.

- = Keine Expression
- o = Schwach positive Expression
- + = Positive Expression
- ++ = Stark positive Expression

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Markerexpression von hMZ in Mono- und Ko-Kultur auf PET bzw. CCC Membranen.

		Kol X	RunX2	Sox9	VEGF
PET	Mono-Kultur hMZ	-	++	++	++
	Ko-Kultur hMZ	-	+	+	+
CCC	Mono-Kultur hMZ	-	+	o	++
	Ko-Kultur hMZ	-	+	-	o

5.3 Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts

Zum Aufbau des 3D Konstrukts wurden die Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] mit mvEZ re-besiedelt und das mit MZ besiedelte Biomaterial in das Lumen der BioVaSc[®] eingebracht. Zuvor erfolgte eine Auswahl des kollagenbasierten Biomaterials für die primären Meniskuszellen. Die Kultivierung des vaskularisierten 3D Konstrukts *in vitro* erfolgte dynamisch in einem Bioreaktorsystem sowohl mit Zellen humanen Ursprungs als auch mit porcinen.

5.3.1 3D Biomaterialauswahl für humane Meniskuszellen

Zur Testung der Zellintegration von hMZ wurden fünf unterschiedliche kollagenbasierte Biomaterialien herangezogen: Das 3D Kollagenscaffold von BD, die BioGide Kollagenmembran von Geistlich, das Kollagen BioMesh von Bard, das Kollagen Typ I Hydrogel, eine elektrogesponnene Matrix aus Kollagen Typ I sowie eine aus Kollagen Typ I und II. Nach der 7-tägigen Kultivierung der Materialien mit MZ erfolgte das Fixieren und Einbetten der Proben in Paraffin. Die Zellmigration konnte am Querschnitt eines jeden Materials beobachtet werden. Die Proben wurden HE gefärbt, wobei sich elastische Fasern und die Kollagenbestandteile der Matrices rot färben und die Zellkerne blau erscheinen. In Abbildung 5.9 sind die HE gefärbten Proben dargestellt. Es lässt sich in (A), (B) und (C) erkennen, dass die Einwanderung der Zellen in die jeweiligen Scaffolds nicht erfolgreich war, da hier die Zellkerne größtenteils am Rand der Matrix zu entdecken sind. Die Zellverteilung ist am Besten bei der Kultivierung im Hydrogel (D) zu bewerten. Eine Migration der Zellen in das Scaffold lässt sich auch bei der elektrogesponnenen Kol I Matrix (E) erkennen. In die Kol I/II ES-Matrix (F) sind die hMZ hingegen nicht migriert und bilden umgekehrt einen mehrschichtigen Zelllayer auf der Scaffold-Oberfläche.

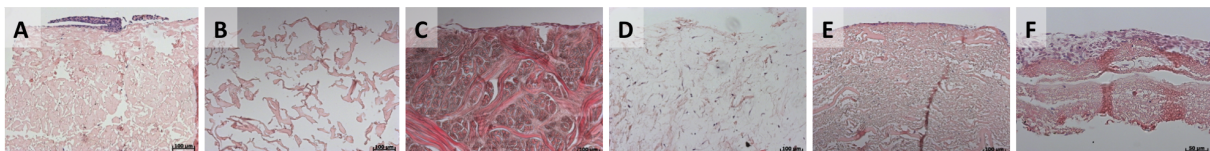


Abbildung 5.9: Zellwachstum von humanen MZ auf unterschiedlichen Biomaterialien auf Kollagenbasis. (A) BD 3D Scaffold. (B) Geistlich Kollagen-Membran, (C) BioMesh-Matrix (D) Kollagen Typ I Hydrogel, (E) Kol I ES-Matrix, (F) Kol I/II ES-Matrix. (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern).

5.3.2 3D Ko-Kulturmodell: Rebesiedelung der BioVaSc®

Zum Aufbau eines vaskularisierten Meniskuskonstruktes wurden die erhaltenen Gefäßstrukturen der BioVaSc® mit humanen und porcinen mvEZ rebesiedelt und dessen Lumen mit einem MZ besiedelten Hydrogel gefüllt. Aufgrund der guten Zellverteilung im Gel (siehe Kapitel 5.3.1), wurde hierfür das Hydrogel gewählt. Die mvEZ sind dadurch am äußeren Rand des Hydrogels lokalisiert, was der Anatomie eines nativen Meniskus entspricht. Es wurden insgesamt fünf Meniskuskonstrukte kultiviert und analysiert, drei davon mit humanen, zwei mit porcinen Zellen. Nach 2 Wochen Mono-Kultur der mvEZ in den Gefäßen und nach einer weiteren Woche Ko-Kultur der mvEZ mit MZ erfolgte ein MTT Assay jeweils an einem Randstück der BioVaSc®, das vorsichtig abgetrennt wurde. Abbildung 5.10 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse des MTT-Tests von fünf unterschiedlichen Versuchsansätzen nach 2 Wochen (erste und zweite Bilderzeile) und drei Wochen (dritte Bilderzeile) Kulturdauer. Die Bilder (A) bis (C) stellen die Ergebnisse des 1. Versuchs, (D) bis (F) des 2. und (G) bis (I) des 3. mit humanen Zellen dar. (J) bis (N) stellt die Ergebnisse der Versuche mit porcinen Zellen dar, wobei (J) bis (L) die des 4. Versuchs zeigt und (M) und (N) die des 5.

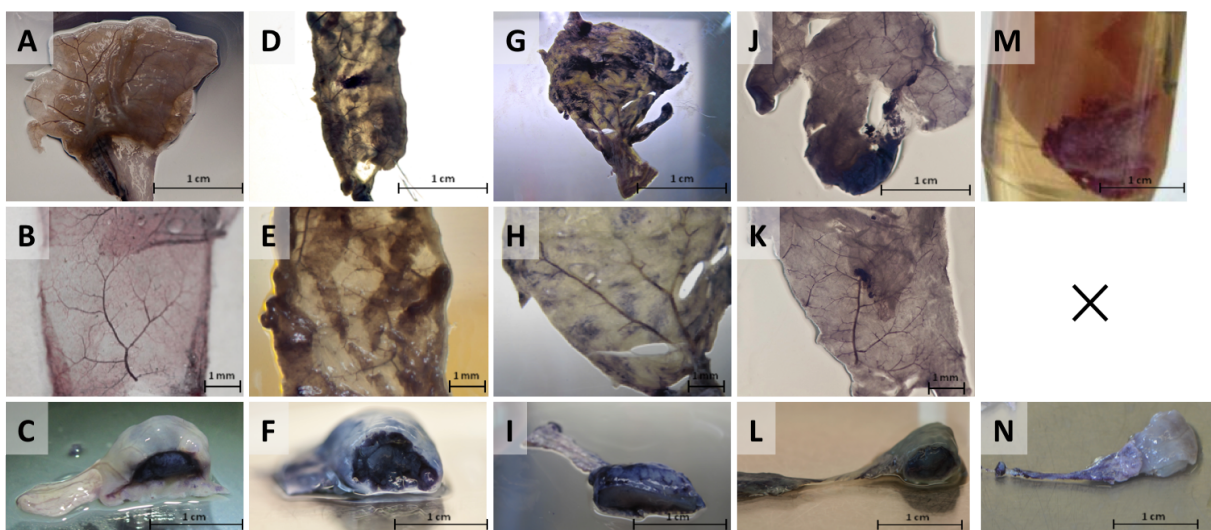


Abbildung 5.10: Vitalitätsanalyse mittels MTT Test drei erfolgreich rebesiedelter BioVaSc® mit hmveEZ nach 14 Tagen Mono-Kultur (ersten beiden Zeilen) und anschließend weitere 7 Tage Ko-Kultur mit hMZ im Hydrogel (dritte Zeile). Versuch 1 (A-C), Versuch 2 (D-F), Versuch 3 (G-I), Versuch 4 (J-L) und Versuch 5 (M,N).(blau=vitale Zellen).

(B),(E),(H) und (K) zeigen jeweils ein Ausschnitt der Bilder (A),(D),(G) und (J). Auf allen dieser Bilder ist eine deutliche blau-violette Färbung in den Gefäßstrukturen zu erkennen, welche auf vitale mvEZ zurück zuschließen ist. In Versuch 1, 2 und 4 ist deutlich sichtbar, dass vitale mvEZ bis in kleinste Verästelung der Gefäße vorgedrungen sind und diese erfolgreich rebesiedelt haben. Daneben stellt der dritte Ansatz eine Besiedelung fast ausschließlich in den Hauptästen der Gefäße dar, wobei der fünfte Ansatz nur im Bereich der Gefäßanschlüsse vitale Zellen aufweist, wie im Bild (M) zu sehen ist. Bei diesen beiden Ansätzen war die vollständige Rebesiedelung der Gefäßstrukturen mit hmvEZ (Versuch 3) bzw. pmvEZ (Versuch 5) nicht erfolgreich.

Nach der Rebesiedelung der BioVaSc[®] mit mvEZ (human und porcine) erfolgte eine weitere Woche Kultivierung der Versuchsansätze im Bioreaktor mit eingefülltem Hydrogel im Lumen. Abbildung 5.10 (C),(F),(I),(L) und (N) zeigen die Bilder nach dem MTT Test an jeweils einem Stück der besiedelten BioVaSc[®] mit Hydrogel im Querschnitt. Bei den ersten vier Ansätzen lassen sich auch noch nach der weiteren Woche in Ko-Kultur vitale mvEZ in den Gefäßen erkennen. Weiter ist eine deutliche Blaufärbung der MZ im Hydrogel zu beobachten, die beim dritten Ansatz, der in (I) abgebildet ist, nicht so stark ausgeprägt ist als bei den ersten beiden Ansätzen und dem vierten Ansatz. Bei Versuch 5, dargestellt in (N), kann außer einer Blaufärbung der pmvEZ in den Gefäßanschlüssen, weder eine Färbung der pmvEZ in den Gefäßen noch der pMZ im Hydrogel beobachtet werden. Die Ergebnisse des MTT Assays der Ansätze mit humanen Zellen sind mit den Ansätzen, die mit porcinen Zellen durchgeführt wurden vergleichbar.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass MZ im Hydrogel nur mit ausreichender Versorgung durch mvEZ in der BioVaSc[®] überleben. Die Zellaktivität der MZ im Hydrogel ist damit von der Rebesiedelung der Gefäße mit mvEZ abhängig.

In Tabelle 5.2 sind die verwendeten Zelltypen und Spezies der einzelnen Versuche, sowie die mikroskopische Bewertung der Besiedlungsergebnisse der Gefäßsysteme mit mvEZ, der Zellmigration in die Matrix und der Vitalität der MZ im Hydrogel zusammengefasst.

- = Besiedelung mit vitalen Zellen nur am Gefäßbaum / keine Zellvitalität im Gel
- o = Geringe Besiedelung des Gefäßsystems / vitale Zellen nur am Rand des Gels erkennbar
- + = Gefäße durchgehend gut besiedelt mit Lücken / mäßig vitale Zellen im Gel sichtbar
- ++ = Sehr gute Besiedelung bis in die kleinsten Verästelungen sichtbar / ausschließlich vitale Zellen im Gel

Tabelle 5.2: Gefäßsystembesiedelung mit mvEZ und mikroskopische Bewertung der Zellmigration, sowie Bewertung der Vitalität der MZ im Hydrogel, Versuche 1 bis 5.

Versuch	Zelltyp und Ursprung	Qualität der Gefäßrebesiedelung	Zellmigration der mvEZ in die Matrix	Zellvitalität der MZ im Hydrogel
1	hmvEZ100 (P3), hMZ22(P3)	++	++	++
2	hmvEZ66 (P2), hMZ36 (P2)	+	o	++
3	hmvEZ101 (P2), hMZ37 (P3)	o bis +	-	o
4	pmvEZ2 (P1), pMZ1 (P5)	++	+	++
5	pmvEZ1 (P2), pMZ1 (P2)	-	-	-

5.3.3 Vergleich der Ko-Kultur Meniskuskonstrukte mit statisch kultivierten Mono-Kulturen

Neben den dynamischen 3D Ko-Kultur Meniskuskonstrukten erfolgten zeitgleich statische Mono-Kulturen der Hydrogele mit hMZ, die als Kontrolle dienen. In Abbildung 5.11 sind Bilder eines MTT Tests der Hydrogele aus zwei statischen 3D Mono-Kulturmodellen (A,B), sowie Hydrogele aus den dazugehörigen dynamischen Ko-Kulturmodellen (A',B') gezeigt. Die Mono-Kultur eines mit hMZ besiedelten Hydrogels erfolgte zum einen in einem Zentrifugenröhrchen (A) und zum anderen in einer nicht besiedelten BioVaSc-Matrix (B).

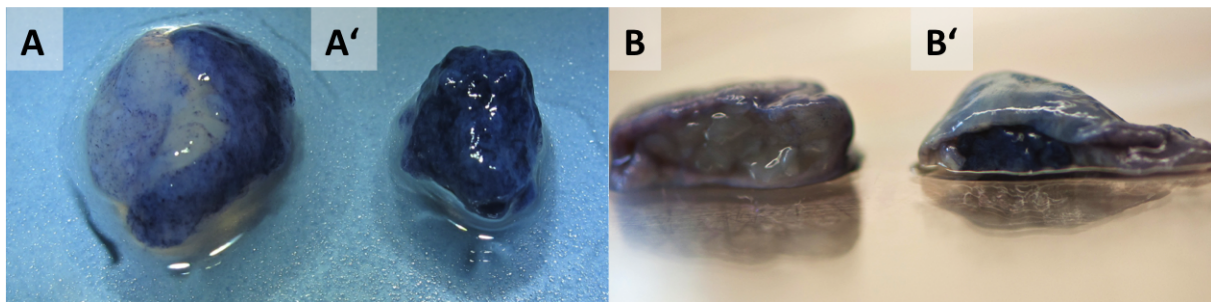


Abbildung 5.11: MTT Test statischer Mono-Kulturen von Hydrogelen mit hMZ im Zentrifugenröhrchen (A) und pMZ in einem azellularisierten, nicht besiedelten BioVaSc[®] Stück (B). Die Vitalität der MZ in den statischen Kontrollen ist deutlich reduziert im Gegensatz zu den dazugehörigen dynamischen 3D Ko-Kultur Meniskuskonstrukten (A'), (B'). (blau=vitale Zellen).

Erfolgt die Kultivierung eines Hydrogels, in welches hMZ eingebracht werden statisch in einem Falcon Röhrchen, können vitale Zellen nur am äußeren Rand des Biomaterials beobachtet werden nach 2 Wochen Kulturdauer. D.h. nur die Zellen, die unmittelbar mit dem Kulturmedium in Kontakt sind, überleben, da die Nährstoffe im Zellkulturmedium nur bis zu einer bestimmten Tiefe in das Hydrogel diffundieren, und so die Zellen in tieferen Ebenen nicht ausreichend versorgt werden. Erfolgt die Kultivierung in Ko-Kultur mit hmvEZ, die sich in den Gefäßstrukturen um das Lumen befinden, können vitale hMZ im gesamten Hydrogel, auch in tieferen Ebenen, nachgewiesen werden. (B) zeigt das Mono-Kulturmodell eines mit pMZ beladenen Hydrogels in einem azellularisierten, nicht besiedelten BioVaSc[®] Stück. In (B') ist ein Stück des porcinen 3D Meniskuskonstrukts (Versuch 4) desselben Zellspenders abgebildet. Bei Abwesenheit der mvEZ in den Gefäßstrukturen können nach einer zweiwöchigen Kulturdauer keine vitalen pMZ im Hydrogel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigen die pMZ im Gel, welche in einer erfolgreich mit pmvEZ rebesiedelten BioVaSc[®] 2 Wochen kultiviert wurden, eine deutliche Blaufärbung.

5.3.4 Neovaskularisation des 3D Meniskuskonstrukts

Betrachtet wurde auch die Kombination und Wechselwirkung des Hydrogels mit der BioVaSc[®]. Nach 3 Wochen Kulturdauer konnte eine gute Verbindung der beiden Biomaterialien beobachtet werden, die in Abbildung 5.12 (A) zu sehen ist. Im MTT Test konnten des Weiteren lebende MZ auf der früheren Lumeninnenseite der BioVaSc[®] festgestellt werden, die aus dem Hydrogel

ausgewandert sind (Abbildung 5.12 (B),(C)). Abbildung 5.12 (D) zeigt eine HE Färbung des Querschnitts, wobei Zellkerne im inneren Lumenbereich sowie Zellkerne in Gefäßstrukturen zu finden sind. Auffallend ist die Lokalisation der Blutgefäße im Bereich des Hydrogels (schwarze Pfeile in der Abbildung 5.12 (B) bis (D)), was auf eine Neovaskularisation hinweist.

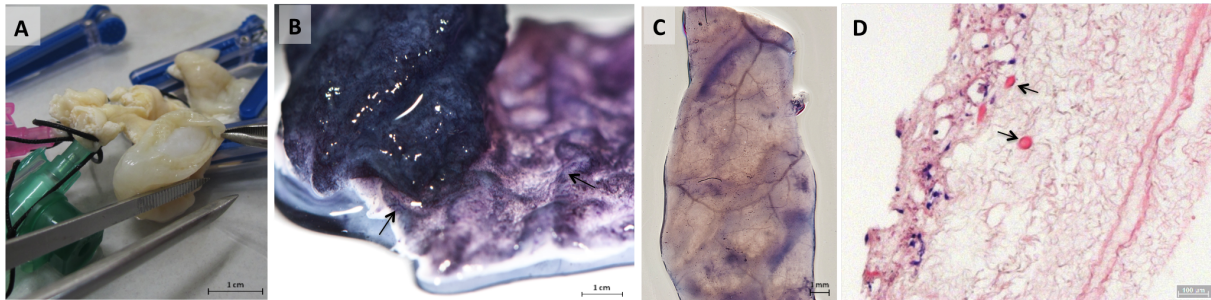


Abbildung 5.12: Verbindung und Integration der MZ und der mvEZ in der BioVaSc[®]. (A) zeigt ein Bild am Ende der Kulturdauer. (B,C) MTT Test des Konstrukts, wobei ausgewanderte vitale MZ auf der BioVaSc[®] sowie vitale mvEZ in den Gefäßstrukturen zu erkennen sind. (D) zeigt die HE Färbung im Querschnitt.

5.3.5 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Der Nachweis der Charakterisierung der hmvEZ in den Gefäßstrukturen erfolgte mit immunhistologischer Färbung des Markers vWF. Nach Rebesiedelung und zweiwöchiger Kultivierungsdauer (Abbildung 5.13 (B)), sowie nach einer weiteren Woche Ko-Kultivierung der hmvEZ mit hMZ (Abbildung 5.13 (C)) können im Querschnitt gefärbte Gefäßstrukturen beobachtet werden. Abbildung 5.13 (A) zeigt den Querschnitt einer nicht besiedelten BioVaSc[®], an diesem keine Färbung zu beobachten ist.

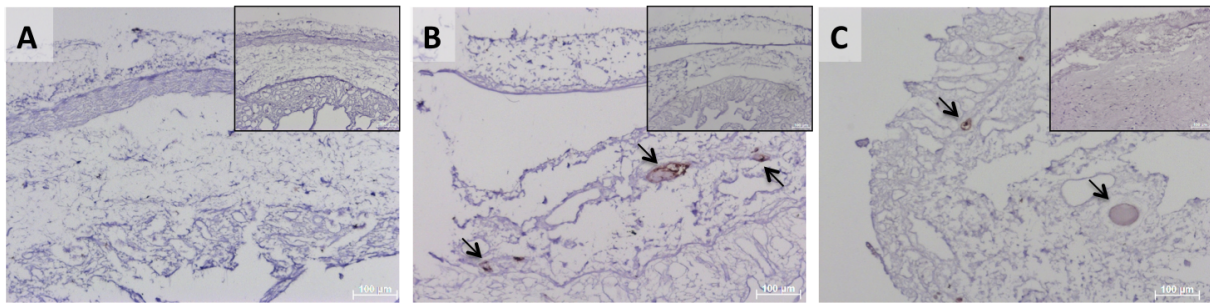


Abbildung 5.13: Immunhistologische Färbung von vWF einer nicht besiedelten BioVaSc[®] (A) und einer erfolgreich rebesiedelten BioVaSc[®] mit hm^vEZ (B,C). Zu erkennen sind ausgekleidete Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] mit vWF-positiven Zellen (Pfeile) nach Mono-Kultur (B) und Ko-Kultur (C) von hm^vEZ mit hMZ. (A) zeigt keine positive Färbung (blau=Gegenfärbung, braun=spezifische Antikörpermarkierung).

Abbildungen 5.14 und 5.15 zeigen die immunhistologische Auswertung der 3D Ko-Kultur Meniskuskonstrukte. Versuch Nr. 2 ist repräsentativ für die Ansätze mit humanen Zellen dargestellt (Abbildung 5.14), Versuch Nr. 4 für die mit porcinen Zellen (Abbildung 5.15). Gezeigt werden jeweils zwei Bereiche der Gewebeproben, der äußere (A) bis (I) und der innere Bereich (A') bis (I').

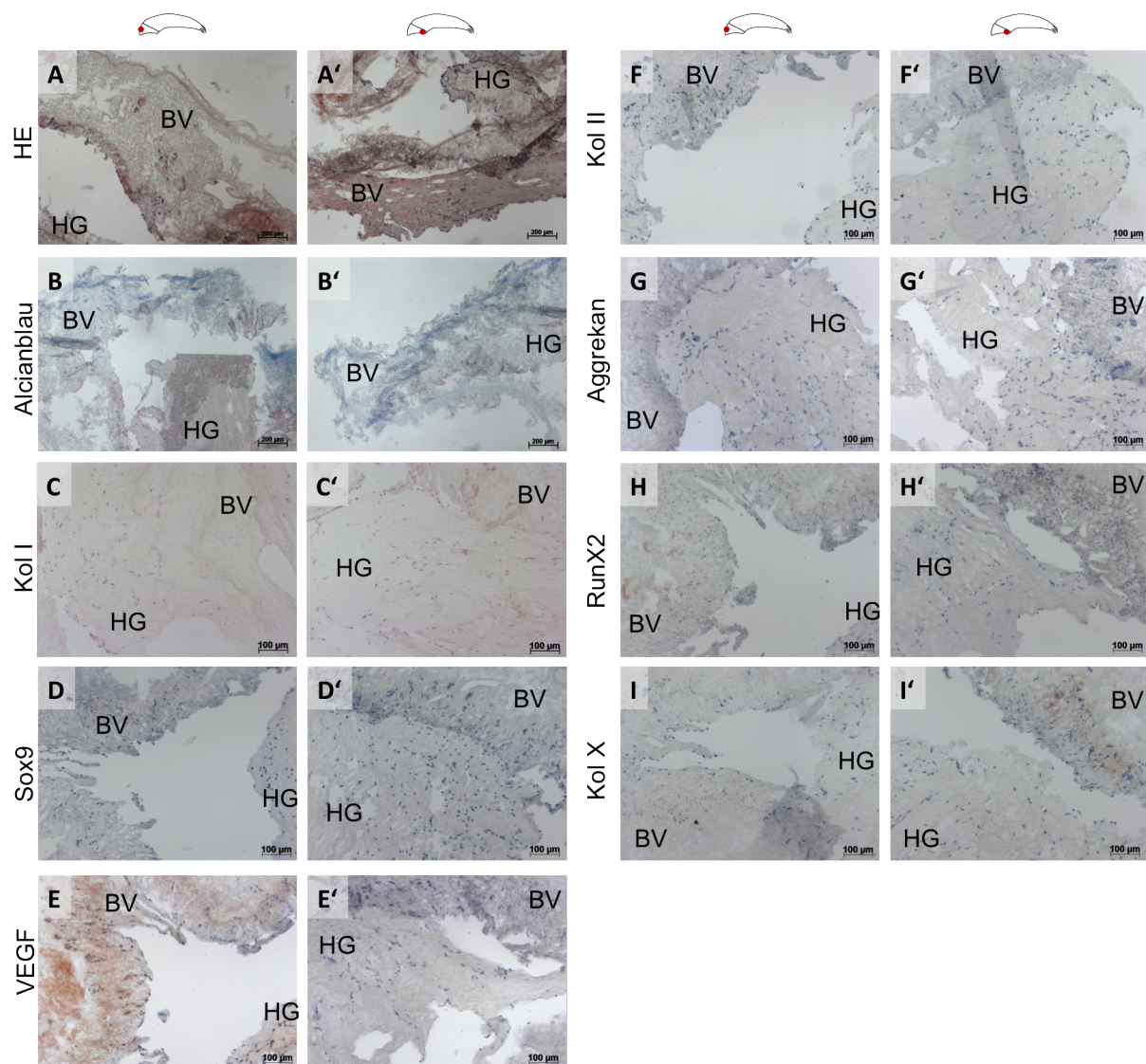


Abbildung 5.14: Übersichtsfärbungen und immunhistologische Färbungen des 3D Meniskuskonstrukts mit Zellen humanen Ursprungs. Dargestellt sind für jede Färbung zwei unterschiedliche Probenbereiche. (A) bis (I) stellt den äußeren Bereich dar, (A') bis (I') den Bildausschnitt des inneren Bereichs (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die BioVaSc® wurde mit BV gekennzeichnet, das Hydrogel mit HG, um sie im Bild besser zu erkennen.

In der HE Färbung und in der Alcianblau Färbung sind im äußeren Bereich des humanen 3D Konstrukts Zellkerne in Blutgefäßen und im Hydrogel blau bzw. rot angefärbt (siehe Abbildung 5.14 (A),(B)). Weniger Zellen sind im inneren Bereich zu finden ((A'),(B')), die in

der Alcianblau Färbung blau gefärbt sind, was auf Proteoglykane hinweist. Eine schwache, nicht spezifische Blaufärbung zeigt sich ebenfalls in der Alcianblau Färbung an den Rändern der BioVaSc[®] Matrix. Blutgefäßstrukturen sind im inneren Bereich keine zu finden. VEGF, ein wichtiges Signalmolekül, das EZ zur Teilung und Migration stimuliert, wird im humanen Modell nur im äußeren Bereich des Meniskuskonstrukts exprimiert (Abbildung 5.14 (E)). Der innere Bereich des 3D Modells zeigt keine VEGF positive Färbung an (Abbildung 5.14 (E')). So auch der Transkriptionsfaktor RunX2, der mit Osteoblastendifferenzierung assoziiert wird, der nur im äußeren Bereich eine leichte Rotfärbung des humanen Meniskuskonstrukts aufweist (Abbildung 5.14 (H), (H')). Die Färbung mit einem Kol Typ X Antikörper ist hingegen im inneren Bereich positiv, während im äußeren Bereich keine Färbung vorliegt (Abbildung 5.14 (I), (I')). Kol Typ X kann in hypertrophen und damit reiferen Knorpel nachgewiesen werden. Die immunhistologische Färbung des Markers Kol Typ I, dargestellt in beiden Abbildungen in (C), (C'), zeigt bei beiden Modellen, human und porcine, eine negative Färbung der Zellen in allen Bereichen der untersuchten Proben. Die verwendeten Marker Sox9 ((D), (D')), Kol Typ II ((F), (F')) und Aggrecan ((G), (G')), die charakteristisch für hyalinen Knorpel sind, sind bei beiden Ko-Kulturmodellen in keinen Bereichen exprimiert.

Im porcinen Meniskusmodell ist die Darstellung der HE Färbung und der Alcianblau Färbung mit dem humanen Modell vergleichbar. Blutgefäßstrukturen lassen sich nur in den Abbildungen des äußeren Bereichs der Proben erkennen (Abbildung 5.15 (A), (B)), während im Bildausschnitt des inneren Bereichs weniger blaue bzw. rote Zellkerne, die einzeln im Hydrogel liegen, vorzufinden sind (5.15 (A'), (B')). Die EZM um diese Zellen zeigen eine leicht bläuliche Färbung in der Alcianblau Färbung. Der äußere Rand der BioVaSc[®] Matrix ist, wie bereits im humanen Modell auch gefärbt, was auf eine unspezifische Färbung deutet. Die Färbung des porcinen 3D Konstrukts zeigt in beiden Bildausschnitten unabhängig des Bereichs eine VEGF-positive Färbung der Zellen (Abbildung 5.15 (E), (E')). Ebenfalls lassen sich porcine Zellen in beiden Bereichen des Konstrukts finden, die den Transkriptionsfaktor RunX2 exprimieren (Abbildung 5.15 (H), (H')). Bei der Kol Typ X Färbung zeigt sich dagegen der inneren Bereich nur vereinzelt schwach positiv, während im äußeren Bereich des porcinen 3D Konstrukts dieser Kollagentyp nicht nachweisbar ist (Abbildung 5.15 (I), (I')).

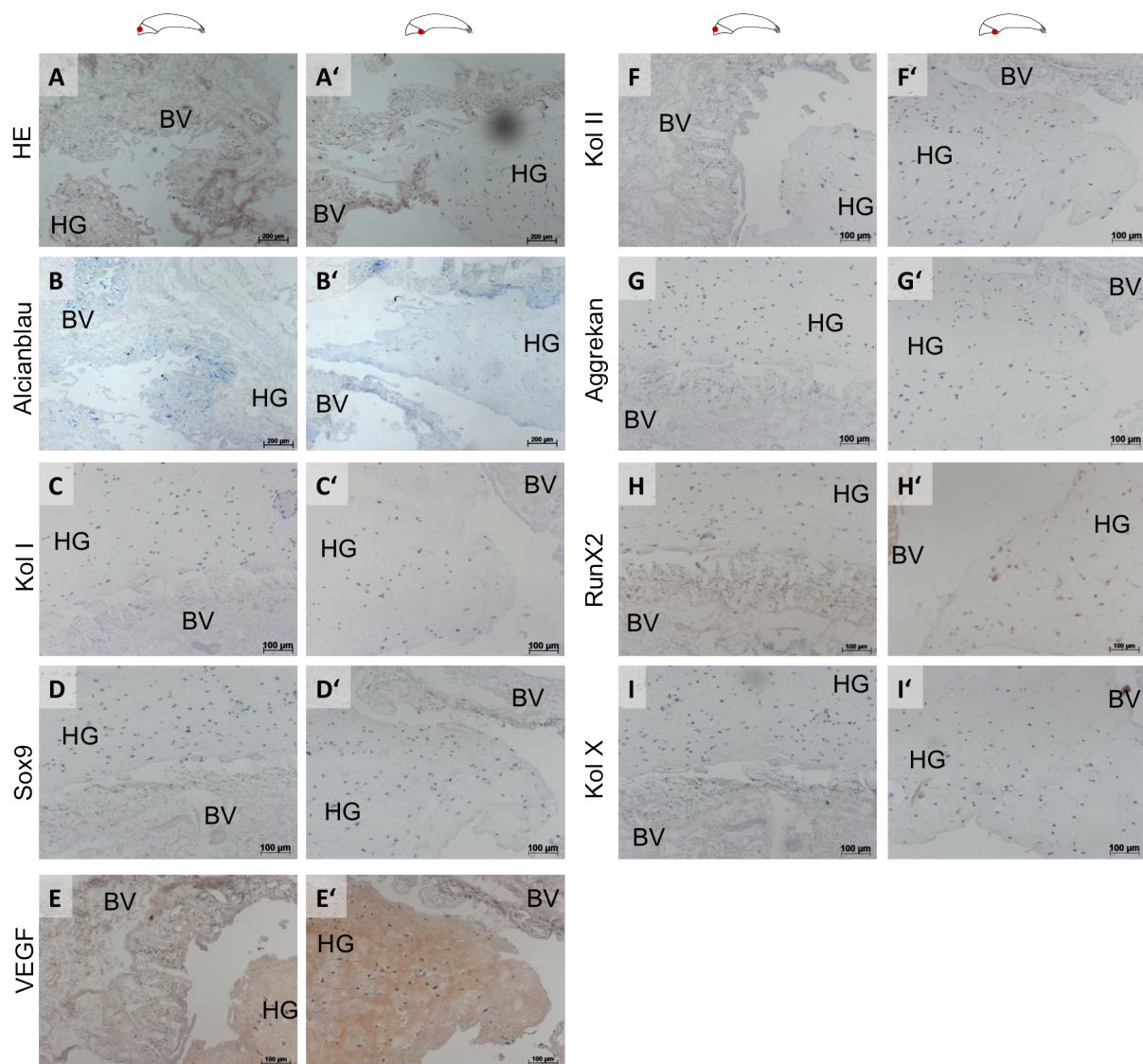


Abbildung 5.15: Übersichtsfärbungen und immunhistologische Färbungen des 3D Meniskuskonstrukts mit Zellen porcinen Ursprungs. Dargestellt sind für jede Färbung zwei unterschiedliche Probenbereiche. (A) bis (I) stellt den äußeren Bereich dar, (A') bis (I') den Bildausschnitt des inneren Bereichs (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die BioVaSc® wurde mit BV gekennzeichnet, das Hydrogel mit HG, um sie im Bild besser zu erkennen.

5.4 Etablierung einer Trägermatrix zur Anregung der Stammzellendifferenzierung

Bei der Entwicklung zellbesiedelter Transplantate, wie in dieser Arbeit das aufgebaute 3D Meniskuskonstrukt, welches in Kapitel 5.3 beschrieben ist, ist die Entnahmestelle der verwendeten Zelltypen von großer Bedeutung. Da zum Aufbau des Konstrukts isolierte Meniskuszellen aus Meniskusgewebe verwendet werden, kann für geforderte Meniskusimplantate nicht immer davon ausgegangen werden, dass autologe Meniskuszellen verfügbar sind, zumindest nicht in ausreichender Menge. Auf Grund dessen werden im Rahmen dieser Arbeit weitere Versuche mit MSZ durchgeführt, die in ausreichender Menge verfügbar und leicht zugänglich sind. Zunächst folgen die Ergebnisse der Zellcharakterisierung, anschließend die Ergebnisse der Materialauswahl eines geeigneten Biomaterials für die Zellen, die Analyse der Faserstruktur und des Aufbaus dieser Matrix, sowie das Differenzierungspotential von hMSZ auf dem ausgewählten Biomaterial, der Kol I/II elektrogewebenen Matrix.

5.4.1 Charakterisierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

MSZ werden zunächst aus humaner Spongiosa bzw. porcinem Knochenmarkspirat isoliert und *in vitro* expandiert. In Abbildung 5.16 und 5.17 (C) sind jeweils Hellfeldbilder der isolierten MSZ (hMSZ in P3 an d3 und pMSZ in P0 an d10) dargestellt. Zur Charakterisierung der Zellen werden diese mit gezieltem Einsatz von Wachstumsfaktoren im Kulturmedium adipogen, chondrogen und osteogen differenziert. Die typischen Färbungen, die zum Nachweis differenzierter MSZ verwendet werden, sind ebenfalls in den Abbildungen 5.16 und 5.17 zu sehen.

In A sind die Triglyceride der nach 14 Tagen fixierten adipogen differenzierten Zellen rot, die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau dargestellt. Im Vergleich ist die Anzahl positiver Zellen bei den humanen höher als bei den porcinen.

Der Kalziumnachweis der osteogen differenzierten MSZ erfolgt durch die Alizarin Rot S-Färbung nach 28 Tagen, die jeweils in (B) dargestellt ist. Es zeigte sich eine stattgefunden Mineralablagerung durch die differenzierten MSZ, wobei die pMSZ eine intensivere Rotfärbung zeigen als die hMSZ.

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung werden die Zellpellets aus MSZ, die sich während der Kultur ausbildeten, fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgt ei-

ne Alcianblaufärbung (D) sowie eine immunhistologische Färbung von Kol II (E),(F) an den Schnitten, um saure Polysaccharide in der extrazellulären Matrix der MSZ nachzuweisen. Die Zellkerne werden bei der Alcianblaufärbung mit Kernechtrot gegengefärbt und stellen sich daher rot dar, während sie bei der immunhistologischen Antikörperfärbung mit Hämatoxylin gegengefärbt sind und somit blau erscheinen. Die EZM der MSZ humanen sowie porcinen Ursprungs, die mit chondrogenem Differenzierungsmedium supplementiert mit TGF- β 3 kultiviert wurden, zeigen eine starke Proteoglykansynthese. Weiter ist die Antikörperfärbung des Markers Kol II sowohl bei hMSZ als auch bei pMSZ stark positiv, der Isotyp hingegen zeigt bei beiden eine negative Färbung, was auf eine spezifische Antikörperfärbung hinweist.

Bei den MSZ, deren Isolation aus humanem Gewebe erfolgte, wurden die Zellpellets, zusätzlich zur Kultur in chondrogenem Differenzierungsmedium mit Stammzellmedium MSCGM-CDr kultiviert. Es konnte keine chondrogene Differenzierung der hMSZ festgestellt werden. Sowohl die Proteoglykansynthese, also auch die immunhistologische Färbung von Kol II ist nicht zu detektieren (Abbildung 5.16 (G) bis (I)). Die Charakterisierung der MSZ mit Hilfe der Differenzierungsansätze erfolgte jeweils an fünf unterschiedlichen Spendern.

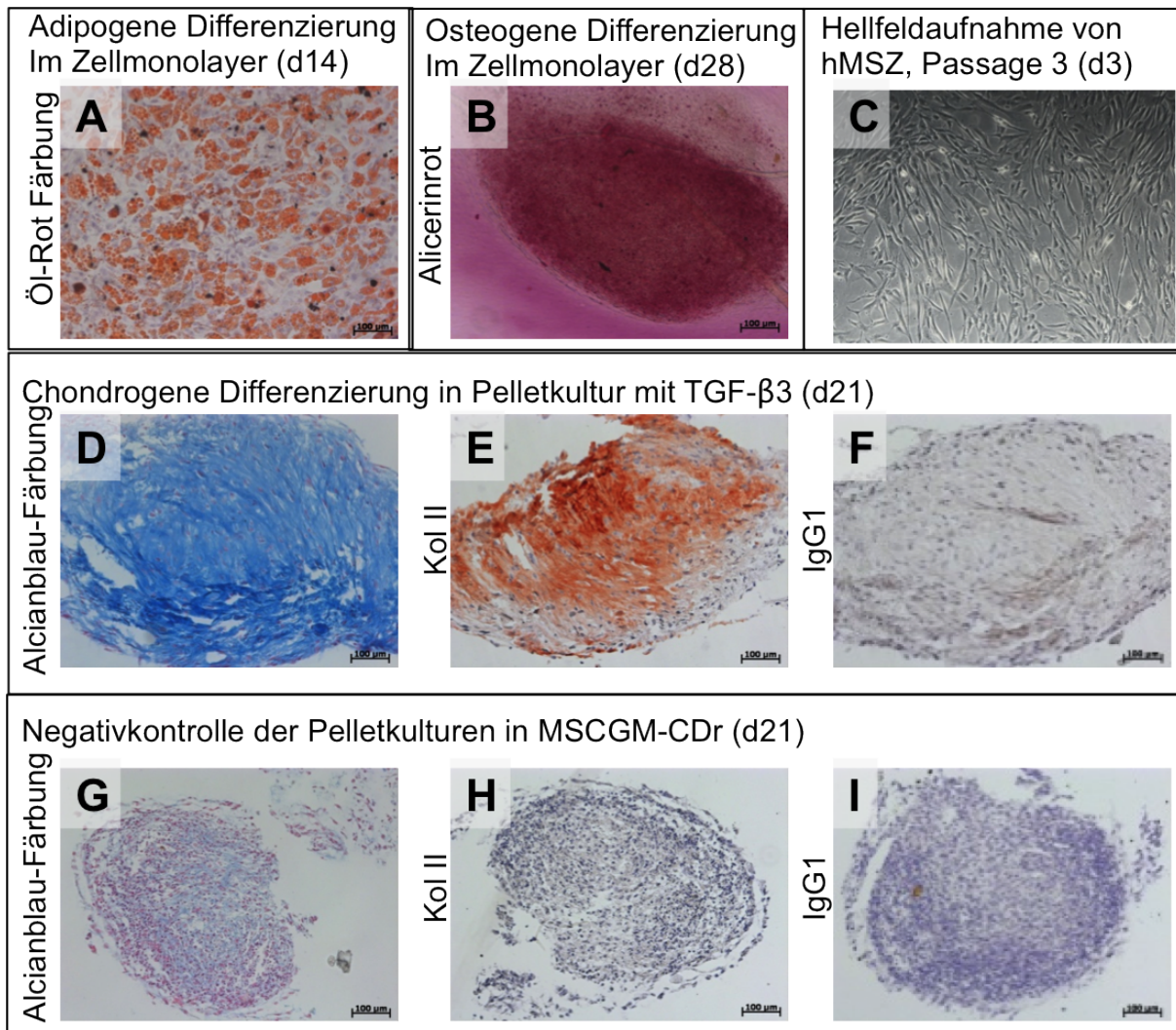


Abbildung 5.16: Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. (A) ist die Ölrotfärbung der adipogen differenzierten hMSZ, (B) zeigt die Alizerinrot Färbung, die die Knochensubstanzen der osteogenen Differenzierung anfärbt. In (C) sind hMSZ aus Passage 3 an Tag 3 im Hellfeld dargestellt. Die Alcianblau Färbung der chondrogen differenzierten Zellpellets zeigt in der Differenzierungskultur eine deutliche Proteoglykansynthese, dargestellt in blau (D), während das in Stammzellmedium kultivierte Pellet keine Proteoglykanproduktion aufweist (G). (blau=saure Proteoglykane, rot=Gegenfärbung) (E,H) zeigen die immunhistologischen Färbungen von Kol II und (F,I) die Isotypkontrolle (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die Pellets wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium (D-F) sowie in Stammzellmedium MSCGM-CDr (G-I) kultiviert und nach 3 Wochen fixiert und gefärbt.

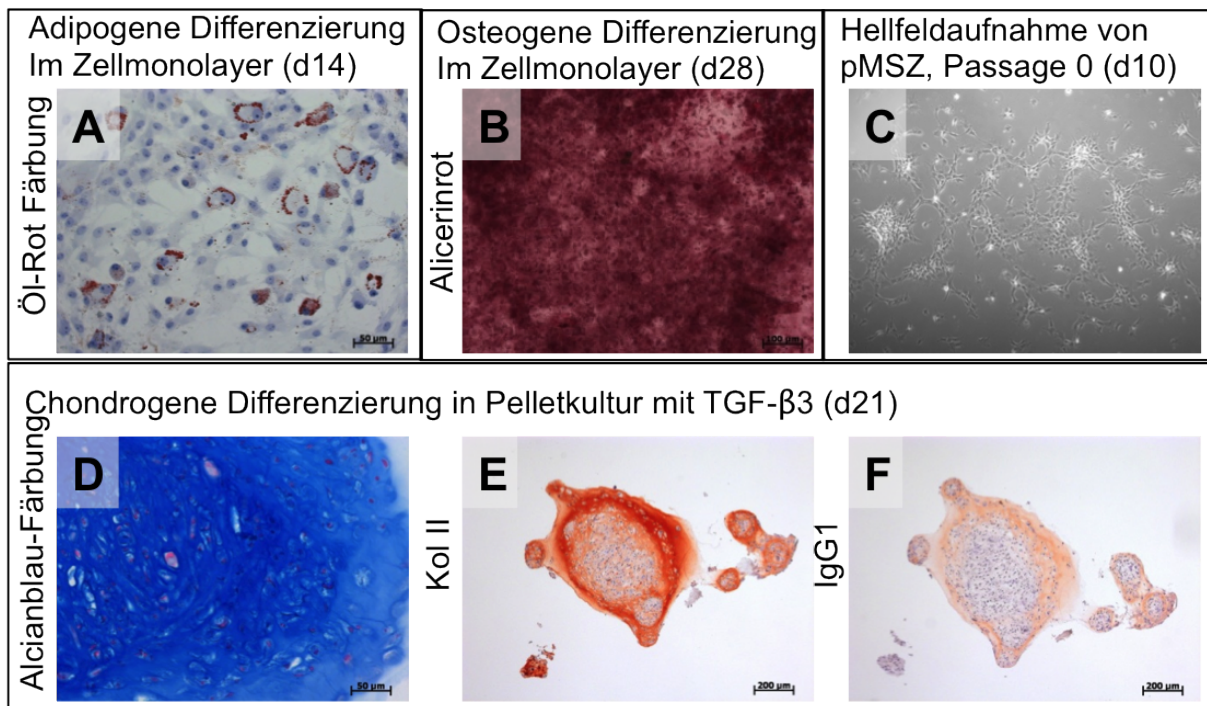


Abbildung 5.17: Differenzierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen. (A) ist die Ölrotfärbung der adipogen differenzierten pMSZ, (B) zeigt die Alizerinrot Färbung, die die Knochensubstanzen der osteogenen Differenzierung anfärbt. In (C) sind frisch isolierte pMSZ an Tag 10 im Hellfeld dargestellt. Die Alcianblau Färbung der chondrogen differenzierten Zellpellets zeigt in der Differenzierungskultur eine deutliche Proteoglykansynthese, dargestellt in blau (D), während das in Stammzellmedium kultivierte Pellet keine Proteoglykanproduktion aufweist (G). (blau=saure Proteoglykane, rot=Gegenfärbung) (E) zeigt die immunhistologische Färbung von Kol II und (F) die Isotypkontrolle (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die Pellets wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert und nach 3 Wochen fixiert und gefärbt.

5.4.2 Biomaterialauswahl für humane Stammzellen

Die Biomaterialauswahl für MSZ ist vergleichbar mit der für MZ, die bereits in Kapitel 5.3.1 beschreiben wurde. Auch für MSZ, die aus humaner Spongiosa isoliert wurden, erfolgte die Testung der fünf unterschiedlich kollagenbasierten Biomaterialien. Die HE Färbung der Schnitte aller Scaffolds, die in Abbildung 5.18 dargestellt sind, lässt erkennen, dass die Zellen ein

gutes Einwandern sowie eine Produktion von extrazellulärer Matrix in den elektrogenen Matrices aufweisen, vor allem aber in der aus Kol Typ I und II Matrix. Das Hydrogel zeigt ähnlich wie bei den hMZ eine homogene Zellverteilung im Gel, wobei auf der BioMesh Matrix, der BioGide sowie dem 3D Kollagenscaffold die hMSZ keine optimale Verteilung aufweisen und nur am äußeren Rand der Materialien zu finden sind.

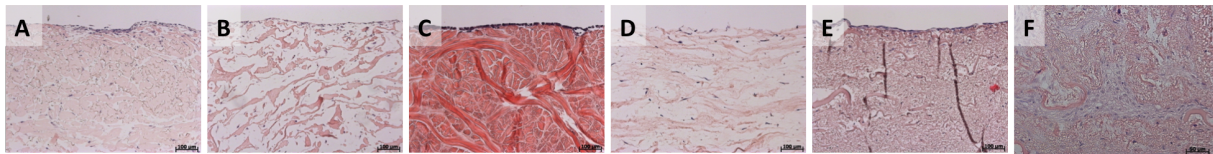


Abbildung 5.18: Zellwachstum von humanen MSZ auf unterschiedlichen Biomaterialien auf Kollagenbasis. (A) BD 3D Scaffold. (B) Geistlich Kollagen-Membran, (C) BioMesh Matrix (D) Kollagen-I-Hydrogel, (E) Kol I ES-Matrix, (F) Kol I/II ES-Matrix (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern).

Auf Grund dieser Auswahl werden im Folgenden die weiteren Experimente mit der elektrogenen Kollagen Typ I/II Matrix durchgeführt und die Ergebnisse dazu gezeigt.

5.4.3 Faserstruktur und Aufbau der elektrogenen Kollagen Typ I/II Matrix

Durch die Verwendung einer rotierenden Welle als Kollektor, deren Drehzahl während dem Prozess variabel verstellbar war, konnte ein Komposit-Scaffold mit Schichten unterschiedlicher Faserausrichtungen hergestellt werden. Die Auswertung des Aufbaus der Kol I/II ES-Matrix und die Faserstruktur der unterschiedlichen Schichten erfolgte mittels REM Aufnahmen. Nach dem Spinningprozess wurden die Scaffolds längs halbiert, so dass die Innenseite zugänglich war. Abbildung 5.19 (A) bis (C) zeigt die REM Aufnahmen der äußeren Kol I Schicht, die das Scaffold oben und unten abrundet. Hierbei ist ein loses Netzwerk aus gleichmäßig dicken Fasern ohne gezielte Ausrichtung zu beobachten.

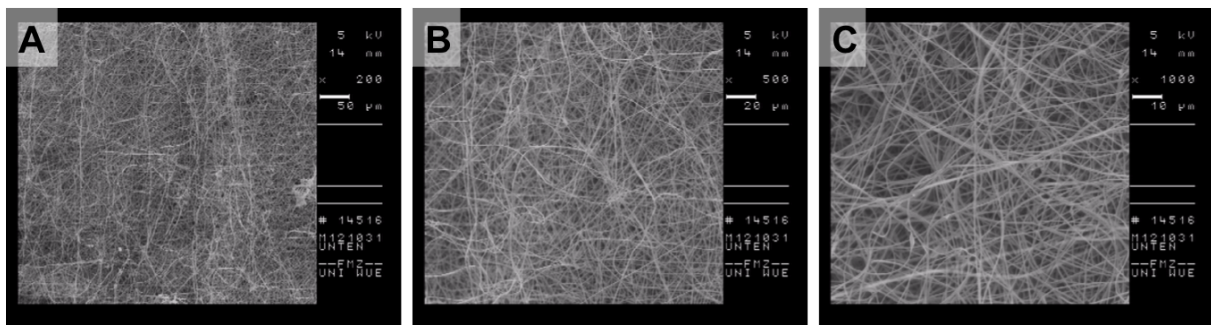


Abbildung 5.19: REM Aufnahmen der Kol I Fasern auf der Außen-/ Oberseite der elektrogesponnenen Kollagenmatrix M121031 vor dem Crosslinken bei unterschiedlichen Vergrößerungen: x200 (A), x500 (B) und x1000 (C) (Beschleunigungsspannung 5 kV, Arbeitsabstand 14 mm).

In Abbildung 5.20 (A) bis (C) sind Bilder mit unterschiedlichen Vergrößerungen der Mittelschicht, die reine Kol II Fasern beinhaltet, dargestellt. In allen Aufnahmen sind ebenfalls einheitlich große, jedoch ausgerichtete Fasern erkennbar. Die Fasern weisen eine deutliche parallele Anordnung auf, die mit der höheren Umdrehungsfrequenz der Welle zu begründen ist. Außerdem ist die Stärke der Kol II Fasern mit ca. 2 µm höher, als die der Kol I Fasern mit weniger als 1 µm.

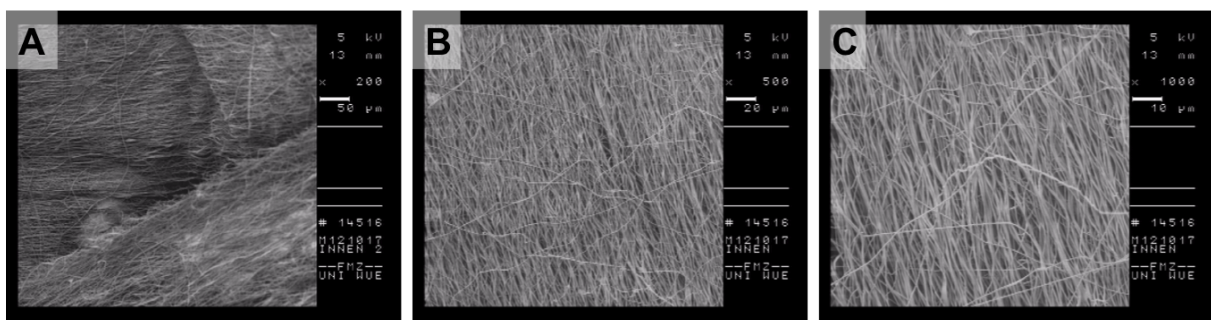


Abbildung 5.20: REM Aufnahmen von der Innenseite (Mittelschicht) des Scaffolds M121017 vor dem Crosslinken bei einer Vergrößerung x200 (A), x500 (B) und x1000 (C) (Beschleunigungsspannung 5 kV, Arbeitsabstand 13 mm).

Der Elektrosponning Prozess zur Herstellung der Kol I/II ES-Matrix erfolgte schichtweise. Die insgesamt fünf Schichten einer Matrix unterscheiden sich durch den Kollagentyp und die Ausrichtung der Kollagenfasern. Abbildung 5.21 stellt die Matrix im Querschnitt dar, wobei in (A) die unterschiedlichen Faserausrichtungen zusammengefasst sind. Die Mittelschicht, Schicht 3

besteht vorwiegend aus parallel ausgerichteten Fasern und die Übergangs- sowie Randschichten oberhalb und unterhalb beinhalten willkürlich ausgerichtete Fasern. Die Fasern der einzelnen Kollagentypen können auch in der HE Färbung voneinander unterschieden werden (B). Die Kol Typ I Fasern der oberen und unteren Schicht stellen hochporige Fasernetzwerke dar wobei die Kol II Fasern in der Mitte ein dichtes Netzwerk aufweisen.

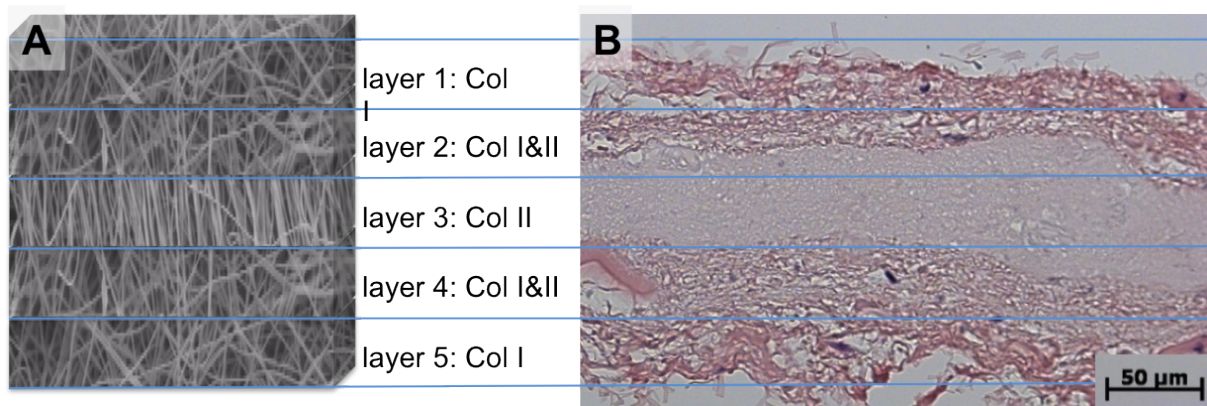


Abbildung 5.21: (A) Darstellung der unterschiedlichen Faserausrichtungen in den einzelnen Matrixschichten. (B) HE Färbung eines 3h gecrosslinkten ES-Scaffolds (rosa=Matrix, blau=Zellkern).

5.4.4 Untersuchung zur Festlegung der geeigneten Vernetzungszeit für die elektrogenesponnene Kollagen Typ I/II Matrix

Durch den Prozess der Vernetzung der elektrogenesponnenen Kollagen Typ I/II Matrix kann eine Erhöhung der Härte, der Zähigkeit, des Schmelzpunktes und vor allem eine Absenkung der Löslichkeit erzielt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Kollagenpolymerlösungen, die in dieser Matrix vereint sind, musste zunächst eine geeignete Inkubationsdauer der Scaffolds im verwendeten Crosslinker (10% HMDI in Isopropanol) gefunden werden. Dabei erfolgten Versuchen mit 1h, 2h, 3h und 4h. Nach dem Crosslink Prozess erfolgte die Analyse der Faserstruktur mit REM Aufnahmen, sowie die Beobachtung der fixierten Scaffolds im Querschnitt direkt nach der Inkubation in der Vernetzungslösung, als auch nach einer anschließenden 7-tägigen Inkubation in Kulturmedium. Damit konnte die Frage nach der Löslichkeit in wässrigen Medien beantwortet werden. Die REM-Aufnahme nach 1h zeigt stabile Kol I Fasern an der Scaffoldoberfläche, während sich die Fasern nach 4h dicker darstellen und miteinander verschmelzen

sind (Abbildung 5.22 (A),(B)). Von den Proben nach 2h und 3h existieren keine REM Aufnahmen. An Tag 0 direkt nach dem Crosslinken sind die fünf Schichten der Proben nach 1h und 2h Crosslinkzeit voneinander getrennt, wobei das Kol II kaum zu erkennen ist (C),(D). Bei diesen Proben ist weiter nach sieben Tagen in wässrigem Kulturmedium die Mittelschicht aus Kol II komplett aufgelöst und nur die Schichten, die aus Kol I Fasern bestehen, sind im Querschnitt zu erkennen (G),(H). Anders bei der Probe nach 3h (E),(I), hier ist die Mittelschicht aus reinem Kol II auch nach sieben Tagen der Inkubation in Medium erkennbar. Die Kol I Schichten zeigen bei dieser Probe ein stabiles Netzwerk und sind wasserunlöslich. Wobei nach 4h Crosslinkdauer die Kol I Fasern der äußeren beiden Schichten komplett miteinander verkleben und eine enge Struktur aufweisen (F). Weiter sind die Kol I Fasern auch nach 4h Crosslinkdauer nicht in Wasser löslich (J). Die Anpassung der Crosslinkdauer der ES Scaffolds erfolgte insgesamt an vier versponnenen Kol I/II Scaffolds.

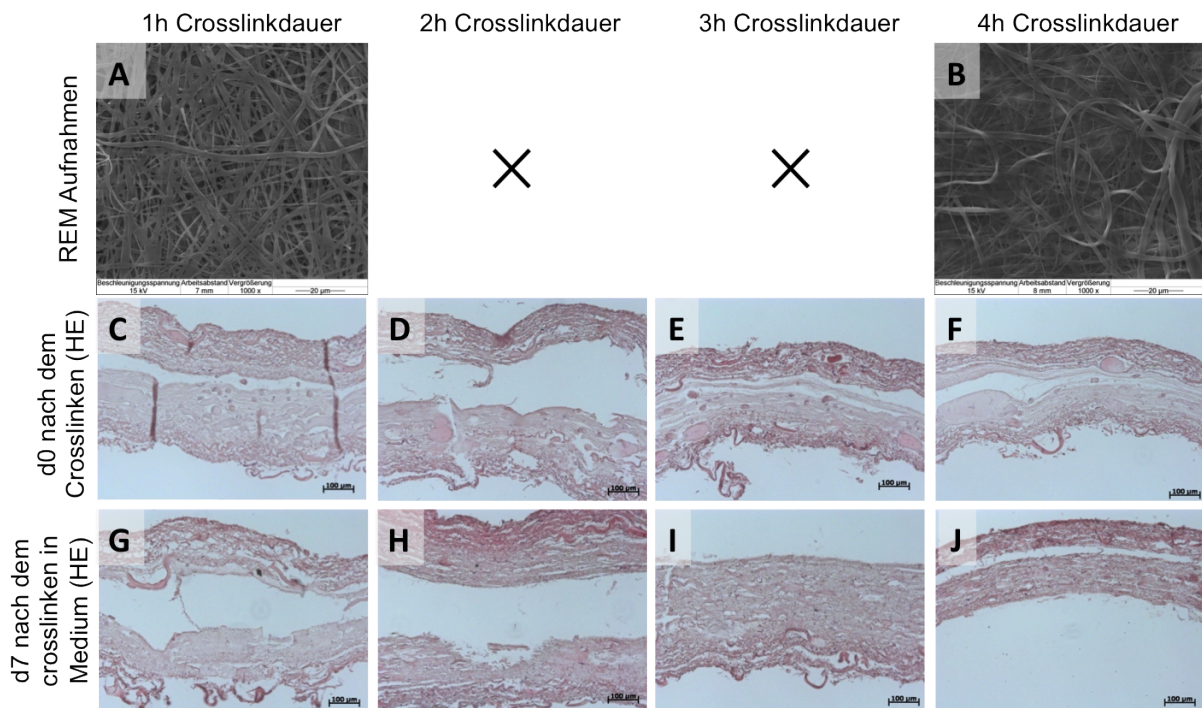


Abbildung 5.22: (A,B): REM Aufnahmen der Kol I Fasern. (A,C,G) zeigt das Scaffold nach 1h, (D,H) nach 2h, (E,I) nach 3h und (B,F,J) nach 4h Crosslinkdauer in 10% HMDI. (C) bis (J) zeigt eine HE Färbung der nicht besiedelten Scaffolds im Querschnitt, wobei (C) bis (F) die Scaffolds an d0 und (G) bis (J) nach 7 Tagen in Medium darstellt (rosa=Matrix, blau=Zellkern).

5.4.5 Untersuchung der Zellmigration auf der Kollagen Typ I/II Trägermatrix

Zur Untersuchung der Zellmigration in das Kol I/II ES-Scaffold folgte die Besiedelung mit DiI gelabelten hMSZ und dessen Untersuchung über einen Zeitraum von 7 Tagen. Zu dem jeweiligen Zeitpunkt wurden Kryoschnitte der in TissueTek eingebetteten Proben angefertigt und mit DAPI versehenem Eindeckmittel Mowiol eingedeckt. Abbildung 5.23 zeigt die Bilder nach 1, 3, 4 und 7 Tagen Kultivierung der hMSZ auf der Kol I/II ES-Matrix, die 3h gecrosslinkt wurde im Hellfeld (A bis D), angeregt mit DSred (E bis H), DAPI (I bis L) und das übereinander gelagerte Bild (M bis P).

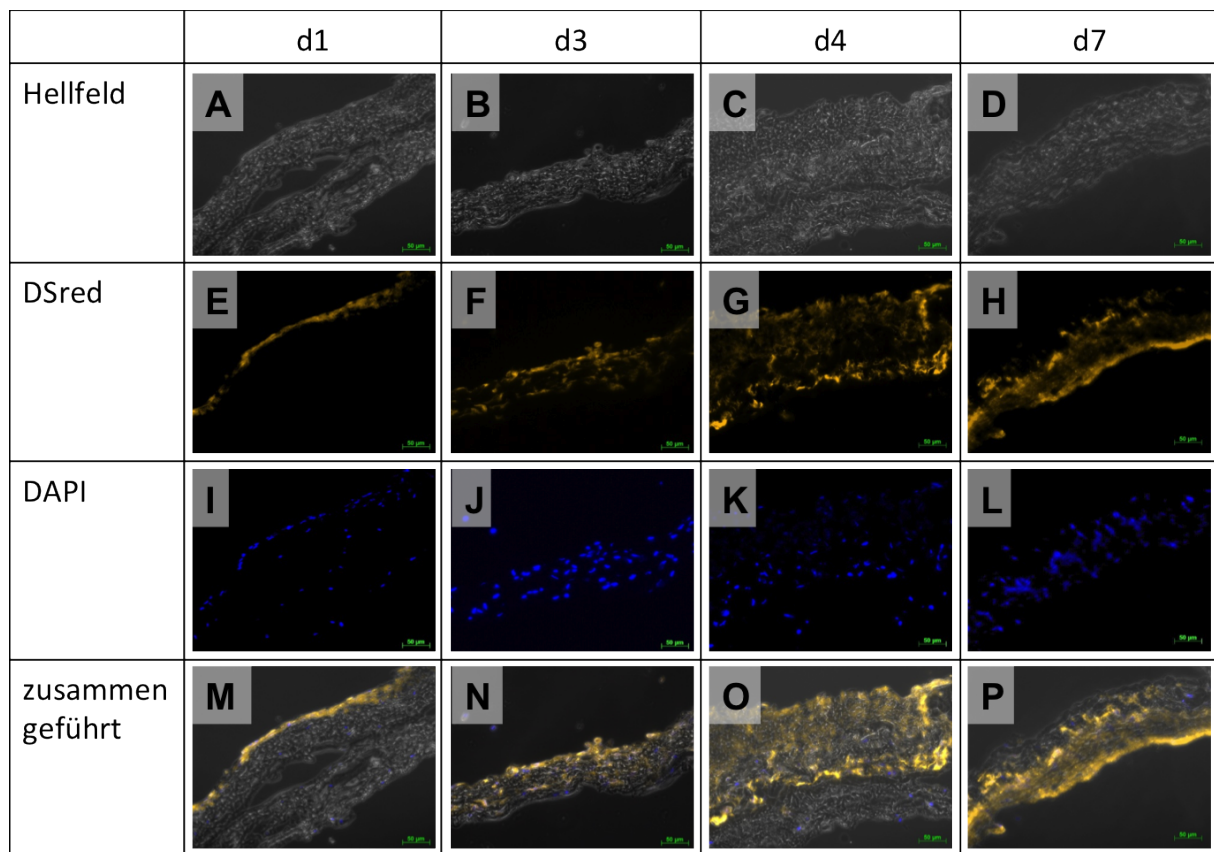


Abbildung 5.23: Migration DiI-gelabelter humaner mesenchymaler Stammzellen auf elektrogewebener Kollagen Typ I/II Matrix 1 Tag (A,E,I,M), 3 Tage (B,F,J,N), 4 Tage (C,G,K,O) und 7 Tage (D,H,L,P) nach der Besiedelung (orange=DiI Fluoreszenzfarbstoff, blau=DAPI Zellkern).

An Tag 1 (A,E,I,M) bilden die Zellen einen Monolayer auf der Besiedelungsseite des Scaffolds, wobei bereits an Tag 3 (B,F,J,N) eine geringe Einwanderung der Zellen in das Innere des Scaffolds zu beobachten ist. Tag 4 (C,G,K,O) zeigt eine vollständige Invasion der hMSZ ins Material, die auch an Tag 7 (D,H,L,P) noch zu erkennen ist.

5.4.6 Untersuchungen zur Zellvitalität

Zur Testung der Vitalität der Zellen auf der elektrogewebten Matrix erfolgte nach 7 Tagen Kultur eine Lebend-Tot-Färbung der mit dem Spender hMSZ14 in Passage 1 besiedelten und fixierten Trägerstruktur M110216, die 1h gecrosslinkt wurde. Die Färbung ist in Abbildung 5.24 dargestellt. (A) stellt die Aufnahme mit dem DSred Filter, (B) mit dem GFP Filter, (C) die Aufnahme mit DAPI Fluoreszenz und (E) die Hellfeldaufnahme der Matrix dar. In (D) sind die Aufnahmen (A), (B) und (C) zusammengeführt. Mit der Vitalitäts-Färbung erfolgt die Identifikation von lebenden Zellen mit Calcein-AM, das durch die Zellmembran in das Innere vitaler Zellen transportiert wird. Diese sind hauptsächlich im Inneren der Matrix zu beobachten. Das EthDh tritt durch die beschädigte Zellmembran in tote Zellen ein und bindet an dessen DNA und lässt diese rot fluoreszieren. In der Abbildung zeigen sich tote Zellen vermehrt am Rand der Matrix.

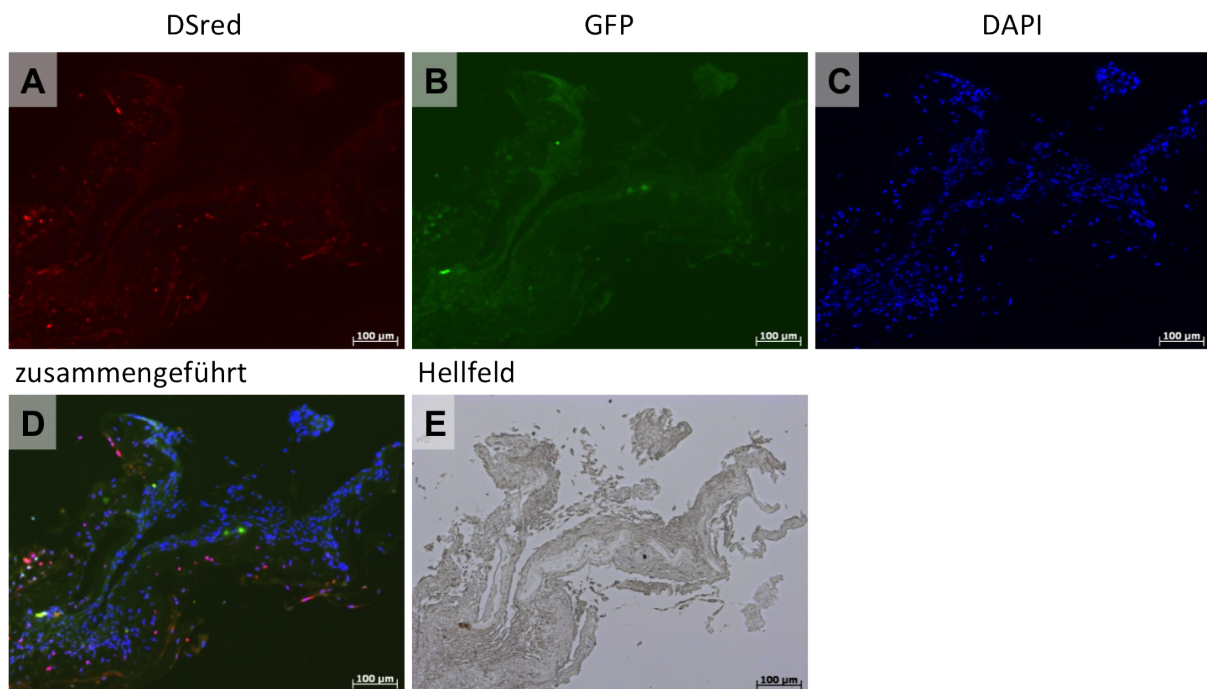


Abbildung 5.24: Lebend-Tot-Färbung humaner mesenchymaler Stammzellen auf elektrogesponnener Kollagen Typ I/II Matrix 7 Tage nach der Besiedelung. Es können lebende Zellen im Inneren der Matrix beobachtet werden, während einige tote Zellen am Rand der Matrix auszumachen sind (rot=tote Zellen, grün=lebende Zellen, blau=DAPI Zellkern).

5.4.7 Untersuchungen zur Zelldifferenzierung

Zur Analyse des Einflusses der Matrix auf die Differenzierung von hMSZ, wurden besiedelte Kol I/II ES-Scaffolds kultiviert und anschließend histologisch sowie immunhistologisch untersucht. Als Kontrolle erfolgte die Alcianblau-Färbung und immunhistologische Färbung des Antikörpers Kol II an einer nicht besiedelten Kol I/II ES-Matrix, die zuvor 1h mit 10% HMDI gecrosslinkt wurde um unspezifische Antikörperbindungen an das Kollagenausgangsmaterial, das zur Herstellung der Matrix Anwendung fand, auszuschließen. In Abbildung 5.25 sind die Färberegebnisse dargestellt. Die Kollagenmatrix zeigt in der Alcianblau-Färbung (A) ausschließlich eine rötlich violette Färbung, was auf eine Eigenfärbung der Kollagenfasern mit dem Kernechtrot hindeutet, während keine Blaufärbung zu erkennen ist. Die Antikörperfärbung verbleibt negativ, sowohl die Färbung des Antikörpers (B) als auch die Isotypkontrolle (C). In allen drei Aufnahmen sind keine Zellkerne zu sehen.

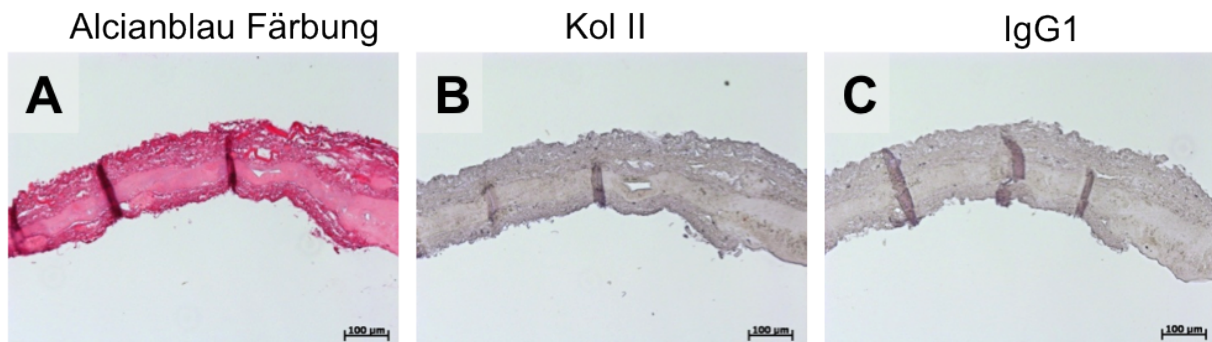


Abbildung 5.25: Zellfreie Kol I/II ES-Matrix (1h gecrosslinkt). Es lassen sich keine Zellkerne sowie spezifische, positive Färbungen erkennen, weder in (A) der Alcianblau-Färbung, noch in (B) der immunhistologischen Färbung von Kol II. (C) zeigt die Isotypkontrolle.

Zunächst erfolgte die Besiedelung der Kol I/II ES-Trägerstrukturen mit hMSZ in Proliferationsmedium unter statischen Kulturbedingungen bis zu 21 Tagen. Die ES-Matrix wurde zuvor 1h gecrosslinkt.

Abbildung 5.26 zeigt die histologischen Übersichtsfärbungen HE und Alcianblau, sowie die immunhistologischen Färbungen der Marker Kol I und II nach 7 (A-D), 14 (E-H) und 21 (I-L) Tagen Kultur des Spenders hMSZ14, Passage 1 auf der Matrix M110216. In der rechten, oberen Ecke der immunhistologischen Färbungen sind die Isotypen dargestellt, die bei allen Proben negativ sind.

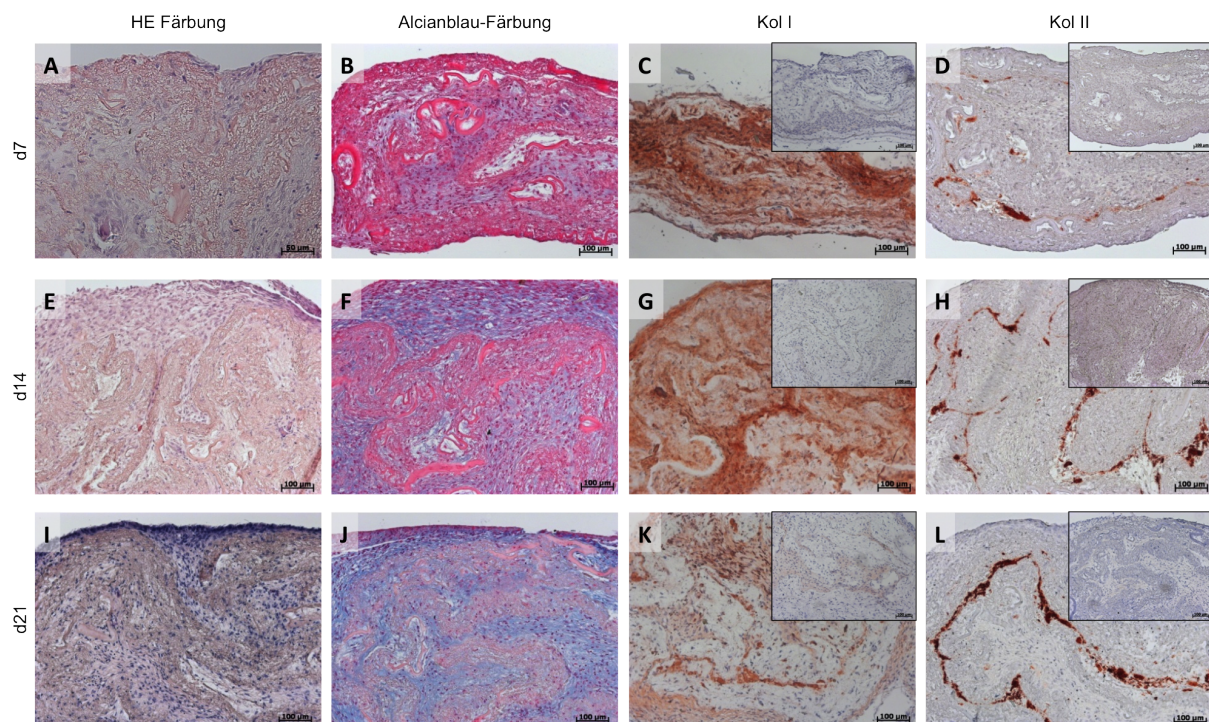


Abbildung 5.26: Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=1h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ14, P1. Ein gutes Zelleinwachsen lässt sich bereits nach 7 Tagen statischer Kultur erkennen (A,E,I) (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern). Die Glykosaminoglykansynthese in der Alcianblau-Färbung (B,F,J) nimmt über die Kulturdauer von insgesamt 21 Tagen stetig zu (rot=Gegenfärbung, blau=saure Glykosaminoglykane). Kol I (C,G,K) und Kol II (D,H,L) zeigen an allen untersuchten Zeitpunkten eine positive Färbung, die Isotypkontrollen verbleiben durchweg negativ (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung).

Ein Zelleinwandern in das Innere der Matrix ist bereits an Tag 7 zu beobachten. Die Proliferation der hMSZ nimmt über die Kulturdauer zu, was in der HE Färbung deutlich durch die Zunahme an Zellkernen zu sehen ist. Eine steigende Proteoglykansynthese lässt sich mit der Alcianblau-Färbung nachweisen, während an Tag 7 kaum saure Proteoglykane angefärbt sind, sind diese an Tag 21 in der gesamten Matrix blau dargestellt. Die Kol I Expression ist an allen drei untersuchten Zeitpunkten positiv, jedoch reduziert sich die Expressionsstärke über die Zeit. Kol II kann über die gesamte Kulturdauer nachgewiesen werden und zeigt gegenüber Tag 7 eine erhöhte Expression an Tag 21.

Es folgten Experimente, bei diesen Kol I/II ES-Matrices nach 3h Crosslinkdauer mit hMSZ besiedelt und unter ebenfalls statischen Kulturbedingungen kultiviert wurden. Dabei wurden

zwischen vier Kulturmedien unterschieden: die Proliferationsmedien MSCGM-CDr Medium mit 2% FCS sowie DMEM/Hams F-12 Medium mit 10% FCS und dem chondrogenem Differenzierungsmedium, sowohl mit als auch ohne den Wachstumsfaktor TGF- β 3. Histologische und immunhistologische Analysen der mit dem Stammzellspender 16 in Passage 1 besiedelten M110216 ES-Scaffolds erfolgten nach 14 Tagen. Es wurden HE Färbungen zur Beobachtung der Zellverteilung (Abbildung 5.27 (A-D)) und Alcianblau-Färbungen zum Nachweis der Proteoglykansynthese (E-H) durchgeführt, sowie immunhistologische Färbungen knorpelspezifischer Marker (Abbildung 5.28): Kol I (A) bis (D), Kol II (E) bis (H), Sox9 (I) bis (L), Aggrekan (M) bis (P), RunX2 (Q) bis (T) und Kol X (U) bis (X). Die molekularbiologischen Analysen der Matrix M120216, kultiviert in den vier Medien nach 7, 14 und 21 Tagen mit dem Spender hMSZ27 in Passage 3, sind in Abbildung 5.29 gezeigt.

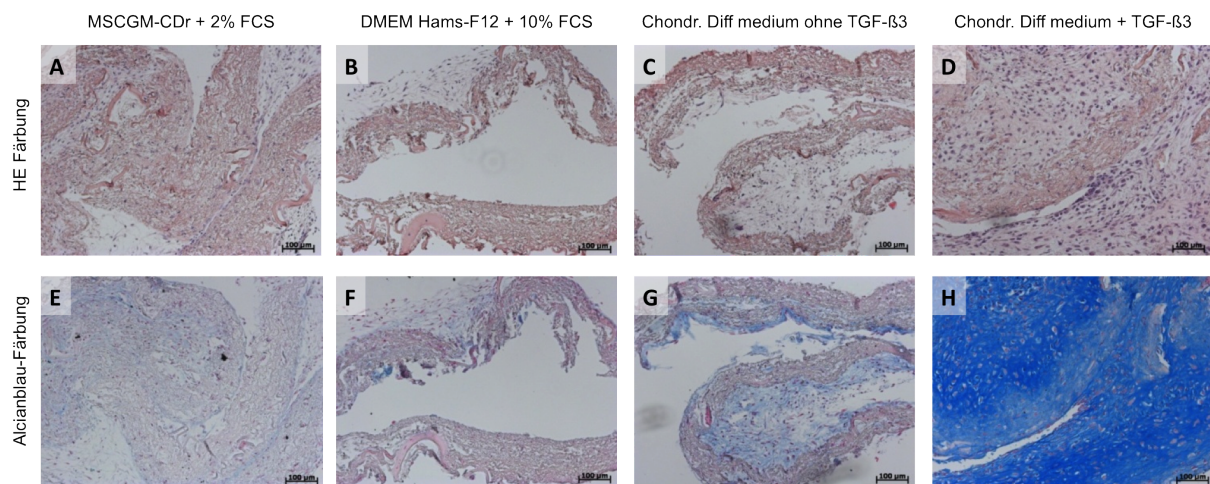


Abbildung 5.27: Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ16, P1, kultiviert in vier unterschiedlichen Kulturmedien, histologische Analysen. (A-D) HE Färbung, (E-H) Alcianblau Färbung.

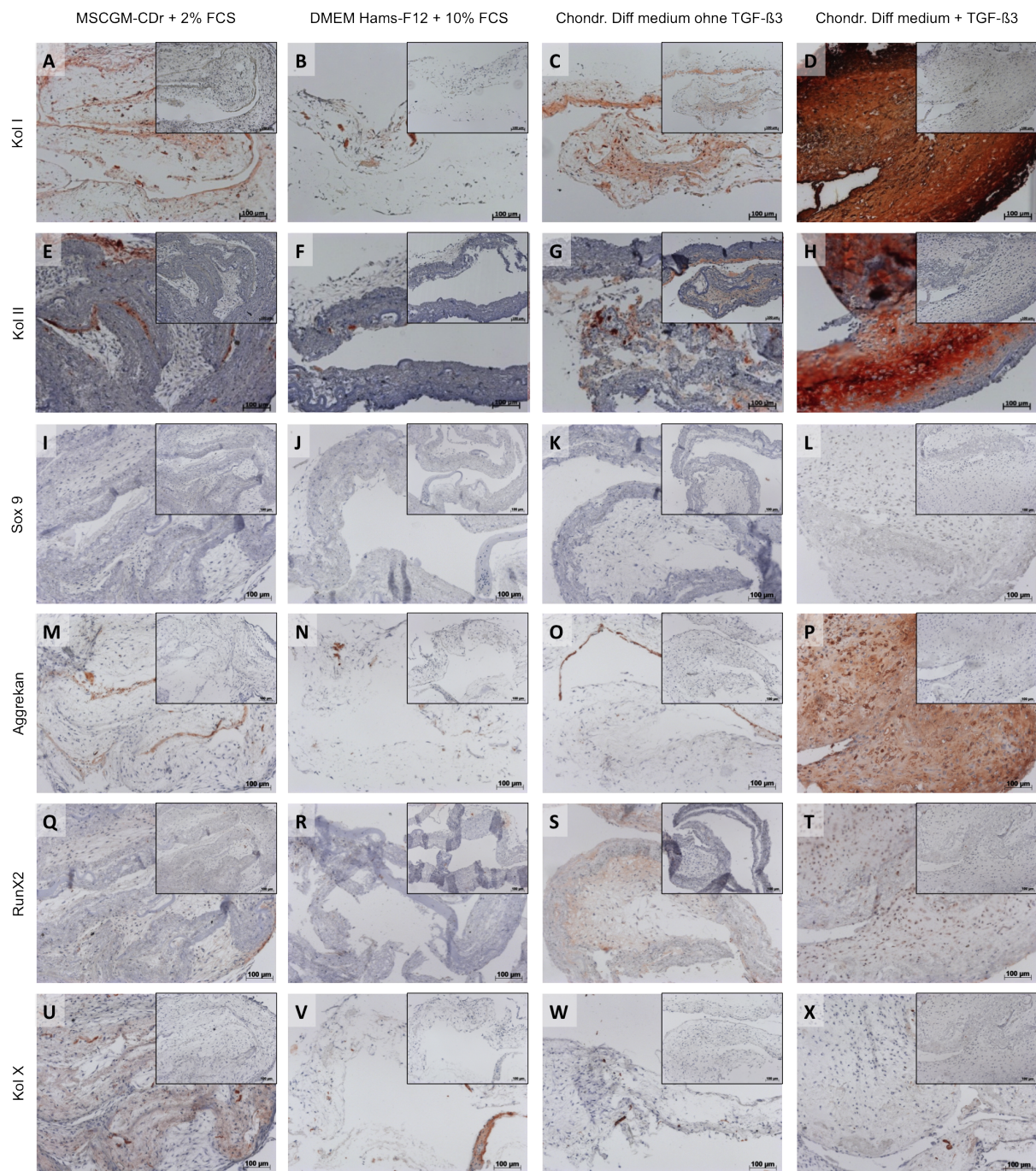


Abbildung 5.28: Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ16, P1, kultiviert in vier unterschiedlichen Kulturmedien, immunhistologische Analysen. Kol I (A-D), Kol II (E-H), Sox9 (I-L), Aggrekan (M-P), RunX2 (Q-T) und Kol X (U-X).

Nach 14tägiger Kultur in dem Stammzellmedium MSCGM-CDr zeigen die Zellen auf einer 3h gecrosslinkten Matrix, ein mit einer 1h gecrosslinkten Matrix in Abbildung 5.26 vergleichbares Expressionsmuster. Die Zellen wandern tief in die ES-Matrix ein, produzieren saure Proteoglykane und zeigen eine positive Kol I und II Expression. Zudem konnten die knorpelspezifischen Marker Aggrekan und Kol X und eine geringe RunX2 positive Expression nachgewiesen werden. Identische Expressionsmuster lassen sich in allen getesteten Medien beobachten, wobei die stärkste Expression der sauren Proteoglykane und der Kol I, Kol II, Aggrekan, RunX2 und Kol X Marker deutlich von den Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium mit TGF- β 3 ausgeht. Die Zellen in dem chondrogenen Differenzierungsmedium ohne zugegebenen Wachstumsfaktor zeigen eine ähnliche Expressionsintensität der Marker, wie die Zellen in dem Stammzellmedium MSCGM-CDr, jedoch weisen sie eine geringere Proliferation auf. Die geringste Proliferationsrate, Matrix- und Proteoglykansynthese, sowie die Synthese der fünf Marker zeigen sich in der Kultur mit dem Medium DMEM/Hams F-12. Sox9, ein früher chondrogener Marker der von Chondrozyten Vorläuferzellen exprimiert wird, zeigte unabhängig des verwendeten Kulturmediums nach 14 Tagen keine Färbung der hMSZ auf der Kol I/II ES-Matrix.

Weiter erfolgten neben den immunhistologischen Färbungen, kommerzielle PCR Analysen, die in der folgenden Abbildung 5.29 dargestellt sind. Zur Durchführung der PCR Ergebnisse erfolgte die RNA-Isolation aus den mit hMSZ beladenen Scaffolds und dessen Umschreibung in cDNA, die in der Gelelektrophorese für alle Proben in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde. Untersucht wurde die Genexpression für die Marker Aggrekan (A), Kol I (D), Kol II (B), Kol X (E) und der Matrix-Metalloprotease MMP3 (C), die eine Rolle im Gewebeumbau spielt. Ef1 α (F) stellt das Housekeeping Gen dar. Für jedes Kulturmedium aus den insgesamt vier Medien wurden Proben nach 7, 14 und 21 Tagen Kultur auf alle Marker analysiert.

Eine positive Expression der Marker Kol I und Ef1 α können an allen drei Zeitpunkten, unabhängig vom verwendeten Kulturmedium in allen Proben festgestellt werden. Die Expression ist dabei für alle Proben von gleicher Stärke.

Eine Expressionszunahme des knorpelspezifischen Markers Aggrekan über die Kulturdauer kann in den Proben, die in chondrogenem Differenzierungsmedium, welches mit TGF- β 3 supplementiert wurde (chondr.+), nachgewiesen werden. Während an Tag 7 eine leicht positive Expression zu sehen ist, nimmt die Expressionsstärke über die Zeit zu. Die Probe des chondrogenen Differenzierungsmediums ohne den Wachstumsfaktor (chondr.-) zeigt an Tag 7 ein negatives Ergebnis, wobei nach 14 Tagen eine leichte positive Aggrekanexpression zu erkennen ist, die an Tag 21 weiter zunimmt. Das gleiche Expressionsmuster wird bei der Probe in DMEM/Hams-F12+10%FCS (HAMS) beobachtet. Die Expressionsintensität an Tag 21 ist verhältnismäßig stärker als die der chondr.- und mit der Intensität der Probe chondr.+ vergleichbar. In der Probe, die mit dem Proliferationsmedium MSCGM-CDr+2%FCS (LONZA) kultiviert wurde,

lässt sich nach 21 Tagen eine schwach positive Aggrekanexpression erkennen. Die Expression an den anderen Zeitpunkten fällt negativ aus.

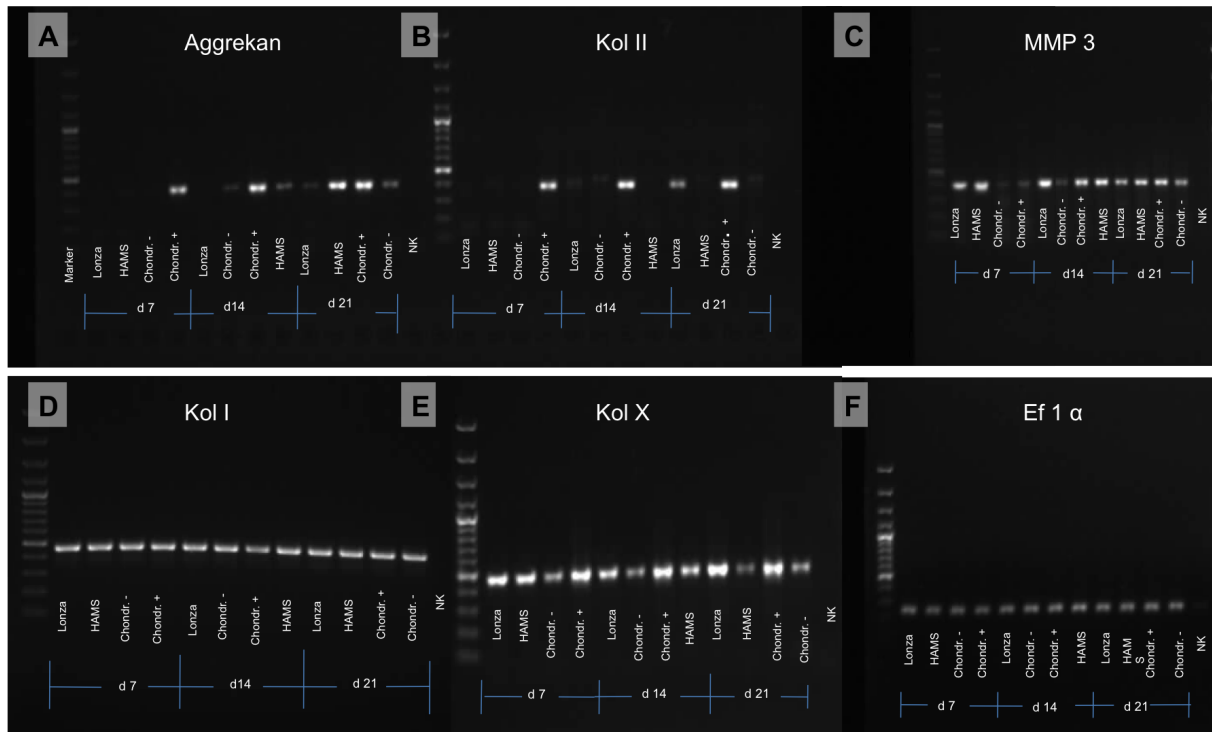


Abbildung 5.29: Kollagen I/II ES-Matrix (M120216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ27, P3. PCR Analysen der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf einer elektrogewebten Kollagen Typ I/II Matrix. (A) Aggrekan, (B) Kol II, (C) MMP3, (D) Kol I, (E) Kol X, (F) Ef1a.

Vergleichbar mit der Aggrekanexpression ist ebenfalls die Expression des zweiten untersuchten knorpeltypischen Markers Kol II bei der Probe chondr.+ bereits an Tag 7 positiv, die mit einer leichten Zunahme bis Tag 21 anhält. Chondr.- weist an Tag 14 und an Tag 21 eine sehr schwache positive Kol II Expression auf. Die kultivierten Proben aller drei Zeitpunkte in dem Medium HAMS sind Kol II negativ, wobei die Proben in LONZA an Tag 14 eine sehr schwache Kol II Synthese erkennen lassen, deren Intensität bis Tag 21 deutlich zunimmt.

Kol X ist ein Marker, der Chondrozyten die bereits im hypertrophen Zustand sind angibt. In allen untersuchten Proben konnte eine positive Kol X Expression analysiert werden. Chondr.- zeigte jedoch nur eine schwach positives Signal an allen drei Zeitpunkten an, während chondr.+ das stärkste Signal von allen aufwies. Die Kol X Synthese der Proben HAMS nimmt über die drei Zeitpunkte in ihrer Intensität ab. Die Signalstärke der Proben LONZA, chondr.- und

chondr.+ bleibt über die Zeit konstant.

Eine MMP3 Synthese ist in allen Proben über den beobachteten Zeitraum nachweisbar. Bei den Proben chondr.- und chondr.+ kann eine leichte Intensitätszunahme über die Zeit der MMP3 Expression analysiert werden. Die Intensität der Proben LONZA und HAMS sind über die Zeit annähernd konstant und miteinander vergleichbar.

In Tabelle 5.3 sind für die unterschiedlichen Medien zu den untersuchten Zeitpunkten zum Vergleich die Expressionen der untersuchten Marker zusammenfassend dargestellt.

- = Keine Expression

o = Schwach positive Expression

+ = Positive Expression

++ = Stark positive Expression

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Markerexpressionen der untersuchten Medien und unterschiedlichen Zeitpunkten.

		Aggr	Kol II	MMP3	Kol I	Kol X	EF1α
LONZA	d7	-	-	+	+	++	+
	d14	-	o	++	+	++	+
	d21	o	+	+	+	++	+
HAMS	d7	-	-	+	+	++	+
	d14	o bis +	-	+	+	++	+
	d21	+	-	+	+	+	+
chondr.-	d7	-	-	-	+	+	+
	d14	o bis +	-	o	+	+	+
	d21	++	-	+	+	+	+
chondr.+	d7	+	+	o	+	++	+
	d14	++	++	+	+	++	+
	d21	++	++	+	+	++	+

5.4.8 Bestimmung des Proteoglykangehalts

Der Proteoglykangehalt der kultivierten hMSZ auf den Kol I/II ES-Scaffolds wurde photometrisch bestimmt und auf den DNA Gehalt der Proben normiert. Abbildung 5.30 (A) zeigt das Diagramm der GAGs, (B) den DNA Gehalt und (C) den prozentualen Anteil an 1 μ g GAG,

normiert auf 1 μg DNA. Verglichen wurden die Zellkulturen in Stammzellmedium MSCGM-CDr mit chondrogenem Differenzierungsmedium supplementiert mit TGF- β 3 nach 7, 14 und 21 Tagen.

Zu erkennen ist bei beiden Medien ein Anstieg der GAG Produktion über die Zeit. Bei den Proben im Differenzierungsmedium ist der Gehalt and Tag 14 und 21 mehr als doppelt so groß, als bei denen im Stammzellmedium, während an Tag 7 die Werte sich nur gering unterscheiden. Beim DNA Gehalt kann ein deutlicher Anstieg im Stammzellmedium bis Tag 21 beobachtet werden (16,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Proben des chondrogenen Differenzierungsmedium zeigen dagegen mit einem Wert von 3,37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and Tag 21 eine geringe Proliferationsrate. Jedoch ist auch hier ein Anstieg der DNA Menge in beiden Medien über die Zeit auszumachen. Werden GAG Gehalt auf DNA Gehalt normiert, so lässt sich erkennen, dass im Stammzellkulturmedium prozentual weniger Zellen über die Zeit Proteoglykane produzieren, was mit einer geringen Abnahme an Anteil GAG pro DNA über die Zeit verzeichnet wird. Begründet kann dies mit der hohen Proliferationsrate im Kulturmedium. Der GAG pro DNA Anteil aus den Proben des Differenzierungsmediums zeigt einen stetigen Anstieg über die untersuchten Tage, bedingt durch die Zunahme der GAG Produktion bei geringem Zellwachstum.

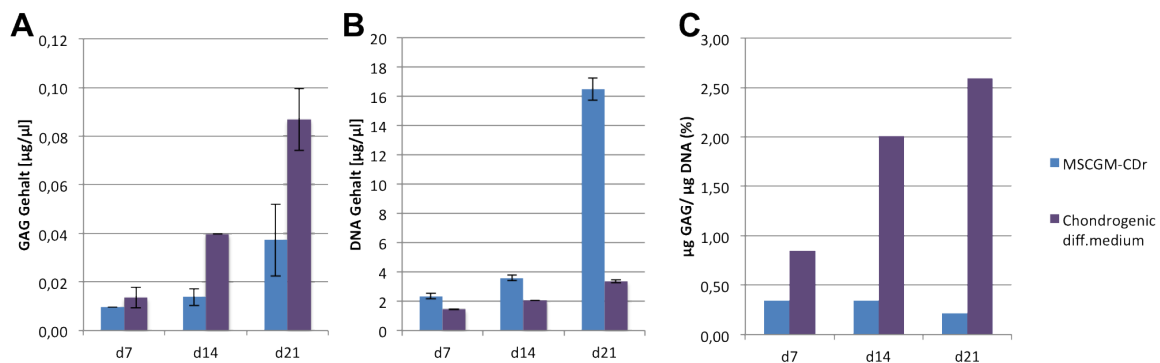


Abbildung 5.30: (A) GAG Gehalt, (B) DNA Gehalt, (C) GAG normalisiert auf DNA von hMSZ, kultiviert auf Kol I/II ES-Matrices nach 7, 14 und 21 Tagen. GAG/DNA reduziert sich im Stammzellmedium mit der Zeit, während im chondrogenem Differenzierungsmedium ein Anstieg zu verzeichnen ist.

5.5 Technische Entwicklung eines gewebespezifischen Bioreaktors

Abbildung 5.31 zeigt ein während der vorliegenden Arbeit umgesetztes Reaktorprinzip, das die Kultivierung des aufgebauten 3D Meniskuskonstrukts unter physiologischen Bedingungen erlaubt. Abbildung 5.31 (A) zeigt schematisch die Baugruppe mit seinen Bauteilen, in (B) ist ein Bild des gefertigten Bioreaktors, integriert in einen Inkubatorschrank zu sehen.

Das Hauptbauteil stellt die Hülle dar, die den Stempel führt und den Mörser an der gelagerten Welle hält. Der untere Probenstisch, auf dem der obere Probenstisch mit vier Stiften aufliegt, ist mit dem Stempel verschraubt. Je nach zu kultivierenden Biomaterialien kann der obere Probenstisch in seiner Ausführung variabel gestaltet und in diesem System verwendet werden, indem er auf den unteren Probenstischhalter aufgesteckt wird. Der Stempel ist in der Hülle flüssigkeitsdicht geführt und kann über einen Druckzylinder von außen hydraulisch bewegt werden. Die Druckkraft auf die Probe wird darüber bestimmt. Zur Ermöglichung von mechanischen Scherkräften im Reaktor erfolgt die Ankopplung der Welle über den Magnetadapter an eine alternierende Rollerschlauchpumpe, die in den Inkubatorwänden bereits integriert und elektronisch ansteuerbar ist. Die durchsichtige Frontplatte aus PC schließt mit einer O-Ring Dichtung den Innenraum der Hülle ab und erlaubt die Sicht ins Innere. Alle Anforderungen an den Reaktor sind in Kapitel 4.14 aufgezählt.

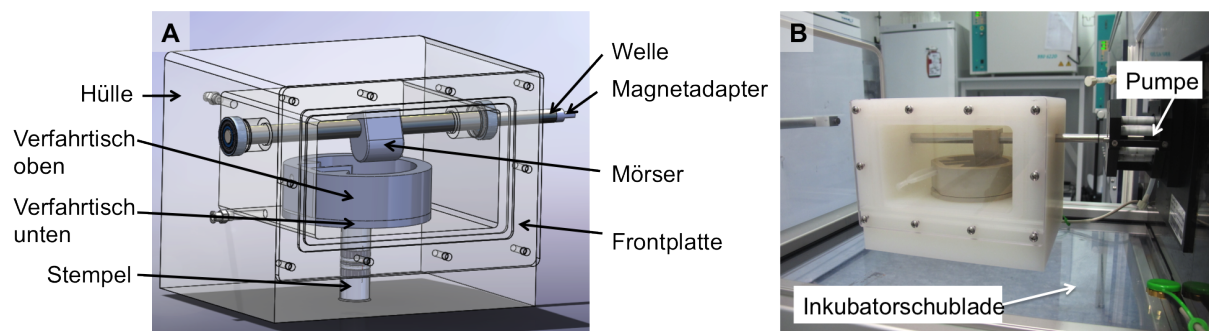


Abbildung 5.31: (A) Schematische Darstellung der Baugruppe des Bioreaktormodells. (B) Gefertigter Bioreaktor aus Bauteilen aus PEEK, PC und V4A Stahl. Durch den austauschbaren, oberen Probenstisch können alle Arten an Biomaterialien mechanisch stimuliert werden.

Zur Kultivierung des vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts auf Basis der BioVaSc[®]-Matrix, erfolgte die Berücksichtigung der Anschlüsse des Gefäßsystems, um einen geschlossenen Kulti-

vierungskreislauf zu etablieren. Die zum Bioreaktor gehörende Peripherie besteht neben einem hydraulischen Druckzylinder, aus einer ansteuerbaren Rollerschlauchpumpe, die einen pulsatischen Fluss für das Gefäßsystem gewährleistet und einer Pumpe, gekoppelt mit der Welle, die alternierend betrieben werden kann zur Simulation einer Kniebeugung und -streckung. Die Abmessungen des Bioreaktors wurden so gestaltet, dass dieser in eine Inkubatorschublade passt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert werden kann. Die Integration in die Inkubatorschrank gewährleistet so die Ankopplung der Welle über den Magnetadapter mit der Rollerschlauchpumpe, die über eine integrierte Steuerung programmierbar ist. Und weiter kann über eine zweite, ansteuerbare Rollerschlauchpumpe der pulsatile Fluss für das rebesiedelte Gefäßsystem erfolgen und während der Kulturdauer über die Benutzeroberfläche beobachtet werden.

Zur Fertigung der Bioreaktorteile erfolgt die Verwendung von biokompatiblen Rohmaterialien wie PEEK, PC oder rostfreier Stahl (V4A), die autoklavierbar sind (siehe auch Kapitel 4.14). Zur Reduzierung der Menge an zu verwendendem Zellkulturmedium kann ein geringes Medienvolumen während der Entwurfsphase durch die Einhaltung eines geringen Innenvolumens in der Reaktorhülle erreicht werden.

Kapitel 6

Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sind Methoden zur Herstellung eines komplexen und funktionellen Meniskuskonstrukts durch Tissue Engineering entwickelt worden. Zur Realisierung der Methoden solch eines komplexen Gewebes sind mehrere Elemente wesentlich: zum einen lebende Zellen, die aus einem Organismus gewonnen werden, zum anderen eine Zellträgerstruktur und letztendlich die Kontrolle der Signaltransduktion, um ein funktionelles dreidimensionales Gewebekonstrukt (Implantat) zu generieren. Die Arbeit basiert auf interdisziplinäre Technologien und beinhaltet die unterschiedlichen Methoden. Dazu zählen die Optimierung der Zellkulturtechnik durch die Generierung von Ko-Kultursystemen und Verwendung unterschiedlicher Nährmedien mit und ohne Wachstumsfaktoren, die zur Differenzierung der Zellen beitragen, die Biomaterialentwicklung zur optimalen Auswahl geeigneter Trägerstrukturen, sowie die Arbeiten mit dynamischen Kultursystemen, den Bioreaktoren.

6.1 Knorpelregeneration und Limitationen

Der Gelenkknorpel überzieht die Oberflächen aller Gelenke, wie des Knies oder der Hüfte. Knorpel ist ein Gewebe, das sehr widerstandsfähig gegen Scher- und Druckkräfte ist und für die reibungsarme Beweglichkeit der Gelenkenden sorgt. Auch die Bandscheiben und Menisken bestehen aus Knorpelgewebe.

Das dreidimensionale Gewebe eines hyalinen Knorpels ist in vier Zonen unterteilt, die je nach Beanspruchung eine unterschiedliche Zusammensetzung ihrer Extrazellulären Matrix (EZM) aufweisen. Die Hauptbestandteile sind Kollagen Typ II und Glykosaminoglykane (Schinagl et al., 1997; Nguyen et al., 2011). Bei einem hohen Kollagenanteil in der oberflächlichen Schicht neben einer geringen Glykosaminoglykan (GAG)-Konzentration, ist die Verteilung in

der unteren Schicht des Knorpels umgekehrt. Die verkalkende Knorpelschicht besitzt einen hohen Anteil an Kollagen X und integriert den Knorpel in den darunterliegenden Knochen (Bhosale and Richardson, 2008; Einhorn et al., 2007; Poole, 1997).

Der Meniskus ist ein Faserknorpel, der hauptsächlich aus Wasser, Kollagenen und Proteoglykanen besteht (Herwig and Buddecke, 1984; Sweigart and Athanasiou, 2001). Zu finden ist der Meniskus im Kniegelenk zwischen Tibia und Femur, wobei die Menisken an zwei Fixpunkten verankert sind (Aumüller et al., 2007). Eine Besonderheit des Meniskus, im Gegensatz zu anderen Knorpelgeweben ist seine Versorgung mit Blutgefäßen. Untersuchungen zeigten, dass der Meniskus im Kindesalter komplett vaskularisiert ist, diese jedoch über die Jahre hinweg zurückgeht bis hin zur Teilvaskularisierung im äußeren Randbereich (Petersen and Tillmann, 1995). Das Meniskusgewebe besteht, wie der hyaline Knorpel ebenfalls aus unterschiedlichen Zonen, deren Bestandteile der EZM variieren. Die sogenannte ‚Red-red-Zone‘, in der ausreichend Blutgefäße vorhanden sind, die dazu führen, dass kleine Risse oder Defekte in diesem äußeren Bereich von selbst heilen (Sweigart and Athanasiou, 2001). Es schließt sich die ‚Red-white‘ Übergangszone in der Mitte und die ‚White-white-Zone‘ im Inneren des Meniskus an, in der keinerlei Blutgefäße zu finden sind und auf Grund dessen in diesem Bereich Knorpelschäden keine Heilungsfähigkeit besitzen. Adultes Meniskusgewebe hat durch seine Teilvaskularisierung ein geringes Regenerationspotential. Kommt es zum Meniskusriss oder -schaden im inneren Bereich, erfolgt eine Teil- oder sogar Totalmeniskektomie, was im fortschreitenden Alter zu Arthroseerkrankungen führt (Krause et al., 1976). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Meniskusimplantate entwickelt, so beispielsweise das kollagenbasierte Meniskusimplantat (CMI) oder das Polyurethan-Gerüst-Implantat Actifit[®]. Diese haben jedoch den Nachteil, nicht an das Blutgefäßsystem des Patienten angeschlossen zu sein und den starken Belastungen im Kniegelenk nicht standzuhalten. Dadurch degenerieren die Implantate über die Zeit und stellen somit keinen langfristigen, funktionellen Ersatz für das Meniskusgewebe dar.

Meniskusallotransplants sind neben dem CMI die einzige Option, größere Meniskusdefekte ersetzen zu können. Im kurz- und mittelfristigen Verlauf kann durch allogene Meniskustransplantationen die Gelenkfunktion verbessert und Schmerzen verringert werden, jedoch erweisen sich Kosten, Verfügbarkeit und Abstoßungsreaktionen als problematisch (Kohn et al., 2011; Messner, 1994b; Scheffler, 2011; Van Arkel and De Boer, 2002).

Die derzeit bekannteste Strategie in der Regenerativen Medizin, Knorpeldefekte reparieren zu können, ist die Methode der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT). Im Jahre 1980 wurde die Methode als eine neuartige klinische Behandlung von Gelenkknorpel als Lösung des Problems der progressiven Degeneration in arthrotischen Gelenken eingeführt und ist seit 1987 im klinischen Einsatz (Brittberg, 1999; Pharmazeutische Zeitung, 2012). Beim Verfahren der klassischen ACT erfolgt in einem ersten chirurgischen Eingriff die Entfernung von 150 bis 300 mg gesundem, autologem Knorpelgewebe von einer nicht belastenden Stelle des Gelenks.

Die isolierten Zellen werden *in vitro* expandiert, bis genügend Zellen erreicht werden, um anschließend diese in einem zweiten chirurgischen Eingriff in den Bereich des Knorpeldefekts zu re-implantieren. Wobei auf den Defekt ein körpereigener Knochenhautlappen wasserdicht aufgenäht wird, damit die eingebrachten Chondrozyten am Platz bleiben und ein Wegschwimmen vermieden wird (Brittberg et al., 1994, 1996). Durch das Einbringen von autologen Chondrozyten in einer Einzelzellsuspension in den bestehenden Knorpeldefekt sollte die Zellkondensation ausgelöst und somit die Kondensationsphase der frühen embryonalen Entwicklung imitiert werden. Sie soll den Chondrozyten einen adäquaten Stimulus bieten, um neue knorpelspezifische Matrix zu synthetisieren und dabei eine Regeneration des Knorpelgewebes im Knorpeldefekt zu erreichen. Zur ACT gibt es Langzeitdaten über zehn bis 20 Jahre und wurde in Deutschland bei etwa 3000 Menschen im Jahr durchgeführt (Pharmazeutische Zeitung, 2012).

Obwohl die ACT bereits länger im Einsatz ist, gibt es jedoch mehrere Herausforderungen, wie die Spendermorbidity, die Dedifferenzierung der Chondrozyten in der *in vitro* Monolayer-Kultur und nach der Zellimplantation die Bildung von Faserknorpel anstelle der Heilung (Dell'Accio et al., 2003; Brittberg et al., 2003; Schulze-Tanzil et al., 2002, 2004; Brittberg, 1999). Ebenso wird bei der ACT zur Gewinnung der Chondrozyten ein gesunder Knorpelbereich beschädigt und ein neuer Defekt gesetzt. Zwei chirurgische Eingriffe bedeuten ein erhöhtes Risiko für den Patienten. Eine weitere große Herausforderung für eine erfolgreiche ACT stellt die Erhaltung vitaler und funktioneller Chondrozyten *in vitro* dar. Knorpelzellen sind *in vivo* fest in ihrer gut strukturierten EZM eingebettet, die dazu beiträgt, dass ihre Zellfunktionalität und -vitalität erhalten bleiben (Shakibaei et al., 1993, 1997; Shakibaei and Merker, 1999). Werden die isolierten Chondrozyten in Monolayer-Kulturen expandiert, sind die Zellen gezwungen, ihren typischen chondrogenen Phenotyp aufzugeben. Die Abwesenheit der spezifischen EZM führt dazu, dass die Zellen nicht die knorpelspezifischen Proteine, wie beispielsweise Kollagen Typ II, sondern die nicht-spezifischen Kollagene, wie Typ I produzieren (von der Mark, 1980; von der Mark et al., 1977; Marlovits et al., 2004).

Die Bereitstellung einer geeigneten 3D Umgebung sowie bioaktive Stimuli, wie beispielsweise der Insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF-1) und der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF- β) konnten *in vitro* ein Ausdehnen und Wiedereinsetzen der Kapazität zur Redifferenzierung der Chondrozyten zeigen (Hunziker, 2001; Schulze-Tanzil et al., 2002; Barbero et al., 2003; Jenniskens et al., 2006; Shakibaei et al., 2006).

Die Matrixbestandteile eines Meniskusgewebes unterscheiden sich von denen eines hyalinen Gelenkknorpelgewebes, die für das Tissue Engineering berücksichtigt werden müssen. Kollagen Typ I stellt beispielsweise ein spezifischer Kollagentyp für den Meniskus dar, aus dem er zum größten Teil besteht. Ein weiterer wichtiger Matrixbestandteil ist Kollagen Typ X, sowie der Transkriptionsfaktor RunX2. Diese Marker lassen sich auch im nativen Meniskus finden. Bestimmte Bereiche eines Meniskus exprimieren zudem auch die knorpelspezifischen Marker

Kollagen Typ II und Aggrekan, wobei isolierte Meniskuszellen diese Marker *in vitro* nicht exprimieren (Rücker, 2011). Weitere interessante Marker, die im Rahmen der Arbeit untersucht wurden sind endothelzellspezifische Marker, wie VEGF, vWF und CD31. Diese Marker werden allerdings nur an den Randbereichen der Gewebe und Gewebemodelle erwartet, da der Meniskus nur am äußeren Rand mit Blutgefäßen versorgt ist.

Für den Aufbau eines Meniskugewebemodells ergibt sich, wie beim Geleknorpel, das Problem der Zellisolation und begrenzten Verfügbarkeit der Fibrochondrozyten, bzw. der Meniskuszellen. Zur Herausnahme dieses Zelltyps wären ebenfalls zwei operative Eingriffe am Patienten nötig, wobei der Meniskus im Gegensatz zum Knorpel kleiner ist und keine nicht belastende Stelle bietet und dieser somit vollständig entfernt werden müsste. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit MSZ als eine alternative Zellquelle durchgeführt, die sich auf einer speziell strukturierten Trägerstruktur in Fibrochondrozyten differenzieren lassen.

6.2 Aufbau von Ko-Kultursystemen mit Primärzellen

Tierversuche sind gesetzliche Vorschrift für die Zulassung von Implantaten und erfolgen zur Prüfung auf Sicherheit und Funktionalität der Implantate und Gewebekonstrukte. *In vitro* Kulturen können dabei helfen, frühzeitige Vorhersagen über die Reaktion und Vergleichbarkeit von Mensch und Tier zu treffen. Daher erfolgte der *in vitro* Aufbau des Meniskuskonstrukts auf Basis zweier Spezies (human und porcine), um Vergleiche und mögliche Unterschiede bereits im Entwicklungsstadium der beiden Modelle zu evaluieren, da Tierversuche sehr kosten- und zeitintensiv sind. Die Auswahl des geeigneten Tiermodells setzt voraus, dass die Experimente mit Tierarten durchgeführt werden, die sich dem Menschen besonders ähnlich verhalten (Greaves et al., 2004). Für den Bereich der Transplantationschirurgie gelten Großtiere, wie Schwein, Pferd oder Schaf als geeignete Tiermodelle, auf Grund annähernd gleicher Anatomie (Forschungsgemeinschaft, 2004).

Es erfolgte zunächst die histologische sowie immunhistologische Untersuchung von humanem sowie porcine Meniskugewebe, wobei festgestellt werden konnte, dass zwischen den beiden untersuchten Spezies nur geringe Unterschiede bestehen. Meniskusspezifische Marker, wie Kol I und Kol X sind im gesamten Gewebe exprimiert, während für Kol II beim porcinen Meniskus keine und im humanen Gewebe eine geringe Expression beobachtet wurde. Aggrekan ist nur in begrenzten Bereichen des Gewebes gefärbt. Die Färbungen mit endothelzellspezifischen Markern wie vWF, CD31 und VEGF zeigen eine positive Färbung am äußeren Rand der Menisken beider Spezies, was die beschriebene Teilvaskularisierung bestätigt.

Tissue Engineering mit Primärzellen

Im Allgemeinen erfolgt im Tissue Engineering der Aufbau eines Gewebemodells durch die Besiedelung von Trägerstrukturen mit Zellen und dessen Kultivierung unter statischen oder dynamischen Kulturbedingungen *in vitro* (Minuth et al., 2005). Die Herstellung von Implantatgeweben ist ausschließlich mit primären Zellen möglich. Aus diesem Grund wurden die Experimente in der vorliegenden Arbeit mit primären Zellen durchgeführt.

Der Einsatz des Meniskuskonstrukts als Implantat setzt voraus, dass die Zellen aus einer gut zu erreichenden Quelle stammen. Unter Berücksichtigung der Verfügbarkeit wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Endothelzellen aus der Haut isoliert und zum Aufbau der Ko-Kulturen verwendet. Bei einer möglichen Implantatherstellung kann Haut autolog entnommen und aufgearbeitet werden, womit eine Abstoßungsreaktion vermieden wird. Nachteilig jedoch ist die lange Aufarbeitungsdauer von mehreren Wochen, die beispielsweise durch ein automatisierten Prozess beschleunigt werden könnte. Es könnten nicht invasive Methoden zur Beobachtung der Zellen angewandt werden, wie beispielsweise die Messung des Transepithelialen Widerstands (TER) und darüber den richtigen Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Zellen sich ausreichend genug vermehrt haben um damit ein Gewebemodell aufzubauen. Weiter könnte der langwierige und kostenintensive Zellisoliations-Prozess durch eine Produktionsstraße abgelöst werden, in der die einzelnen Arbeitsschritte eines Protokolls von einer Maschine zum Teil parallel ausgeführt werden und somit Zeit spart.

Alternativ zu den mvEZ gibt es in der Literatur zahlreiche Arbeiten, die mit Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) arbeiten (Nakatsu et al., 2003; Hofmann et al., 2008; Santos et al., 2008). HmvEZ sind im Vergleich zu HUVEC in ihrer *in vitro* Kultivierung deutlich anspruchsvoller. Dies zeigt sich in einer geringeren Ausbeute bei der Isolation, sowie ihrem langsameren Wachstum ausschließlich in speziellem Kulturmedium. Verwendet wurde das endothelzellspezifische Medium VascuLife[®], das 2% FCS beinhaltet und somit nur einen geringen Serumgehalt hat.

Wichtig für eine spätere Implantatherstellung ist der Serumgehalt im Kulturmedium. Durch seine Herkunft aus tierischem Material ist Serum biochemisch nicht definierbar. Je nach Charge des Produkts, können die damit kultivierten Zellen unterschiedlich reagieren, indem die Zusatzstoffe des Serums variieren. Da das Serum aus Tieren gewonnen wird, kann es außerdem zur Beeinflussung der Produktionsabläufe kommen, wie beispielsweise eine Verzögerung durch die Herstellung des Serums. Bei der Implantatentwicklung und -herstellung gibt es Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe und -umgebung, bezeichnet wird dies als gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, kurz GMP). Essentiell für ein GMP Prozess ist die Regulierung, Definition und Dokumentation aller verwendeten Lösungen.

Eine weitere Alternative zu hmvEZ bzw. HUVEC stellen Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) dar. EPC sind im Blut zirkulierende Zellen, die die Fähigkeit haben, zu Endothelzellen zu dif-

ferenzieren. Für die Gewinnung der EPCs entfällt die Entnahme einer Biopsie beim Patienten, es genügt lediglich eine Blutabnahme. Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Definition von zelltypischen Markern, um die Zellen ausreichend charakterisieren zu können (Balaji et al., 2013).

Da ein Implantat meistens die Folge eines Meniskusschadens ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass gesunde Meniskuszellen autolog gewonnen werden können, um das Implantat aufzubauen. Dennoch erfolgte in dieser Arbeit im ersten Schritt der Aufbau von Zellkulturen mit primär isolierten Meniskuszellen aus humanem sowie porcinem Meniskusgewebe als zweiten Zelltyp. Bei der Zellisolation wurde nicht zwischen den unterschiedlichen Gewebezonen unterschieden.

Neben den primären MZ wurde ein dritter Zelltyp aus einer alternativen Zellquelle verwendet: Adulte mesenchymale Stammzellen, die aus humaner Spongiosa bzw. Knochenmarksaspirat vom Schwein gewonnen wurden und, wie bereits die mvEZ, autolog zugänglich sind.

Der Aspekt der Spendervarianz ist bei Verwendung von primären Zellen ein entscheidender Punkt, der bei der Auswertung der Versuche berücksichtigt werden muss. Durch die direkte Isolation der Primärzellen aus Gewebebiopsaten gibt es Variabilitäten des Phenotyps der einzelnen Spenderzellen. In Studien zu Therapie- oder Medikamentenentwicklungen reagieren Spenderorganismen oft unterschiedlich. Der Trend geht, aus diesem Grund, in Richtung patientenspezifische Therapien. Dies bedeutet, dass gezüchtete Implantate oder Testsysteme speziell nur für eine Gruppe von Patienten helfen. Die unterschiedlichen genetischen Informationen und das Alter von Patienten haben einen wesentlichen Einfluss auf die Therapie. Bereits in der heutigen Medizin gibt es Patientengruppen, deren Tumor auf bestimmte Medikamente ansprechen, die über prädiktive Biomarker ausgewählt werden (Stratmann et al., 2013). Es gibt Arbeiten, die Tumortestsysteme für Medikamententestungen auf Basis primärer Zellen, die aus Patiententumorgewebe gewonnen werden, aufbauen. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung individueller, personalisierter Medizin (Reboredo et al., 2013).

Verwendung von Stammzellen als Zellquelle

Undifferenzierte Vorläuferzellen, die ein multilineares Differenzierungspotential aufweisen und im Körper überall zu finden sind, gelten als eine gut geeignete Zellquelle für den Aufbau von Gewebekulturen im Tissue Engineering. Speziell in der muskuloskelettalen Forschung spielen MSZ eine wichtige Rolle, da sie zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bändern, Sehnen und Fettgewebe beitragen (Caplan and Dennis, 2006).

Mesenchymale Stammzellen stellen eine vielversprechende Zellquelle für die Knorpelregeneration dar, da sie ein chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen, in großen Mengen gut zu isolieren und *in vitro* zu expandieren sind, ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren

(Caplan and Goldberg, 1999; Pittenger, 2008). Sie sind multipotential und weisen ein geringes immunogenes Profil auf (Csaki et al., 2008; Amado et al., 2005).

Eine alternative Zellquelle zu Knochenmarksaspirat zur Isolation von adulten Stammzellen könnte beispielsweise Blut sein. Vorteil dabei ist die leichtere Zugänglichkeit und routinierte Entnahme beim Patienten. Die sogenannte Stammzellapherese, dem Herausfiltern der im Blut enthaltenen Blutstammzellen, stellt mittlerweile die bevorzugte Methode der Stammzellentnahme im Rahmen einer Transplantation dar, da sie weniger invasiv als eine Knochenmarkentnahme ist (ZKRD, 2012).

Eine weitere Stammzellquelle ist Fettgewebe, aus der adipöse mesenchymale Stammzellen (ADSZ) gewonnen werden können, die bereits in vielen Versuchen für unterschiedliche Anwendungen verwendet werden.

Das verwendete Expansionsmedium MSCGM-CD der Firma Lonza mit geringem Serumgehalt (2% FCS) ist spezielles Stammzellmedium, das für die MSZ verwendet wurde und für einen späteren GMP Prozess angepasst werden müsste. Nach erfolgreicher Isolation der mesenchymalen Stammzellen erfolgte deren Charakterisierung, indem sie in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenziert wurden. Die Differenzierungen erfolgten in den jeweiligen Medien, welche für jede Linie spezifisch zusammengestellt und mit benötigten Zusätzen und Wachstumsfaktoren supplementiert wurden, wie beispielsweise das chondrogene Medium, das dem Wachstumsfaktor TGF- β 3 zugefügt wurde (Nöth et al., 2007). Erfolgt die Kultur der humanen Zellpellets, identisch mit dem chondrogenen Differenzierungsansatz, jedoch in Stammzellkulturmedium MSCGM-CD+2%FCS wird keine Proteoglykansynthese festgestellt und die Zellen synthetisieren kein Kollagen II, was immunhistochemisch belegt wurde.

Obwohl die MSZ in Tiermodellen als eine gute Möglichkeit für den Knorpelersatz gelten und neuartige Ansätze getestet wurden, bei denen MSZ als alternative Zellquelle für patienteneigene Chondrozyten Verwendung fanden, ist mehr Forschung nötig, die zu einer möglichen klinischen Anwendung der Zellen führt (Csaki et al., 2008). Es besteht das Problem, dass bei den *in vitro* Stammzellkulturen Wachstumsfaktoren in die Nährmedien zugegeben werden, um diese differenzieren zu können. Wachstumsfaktoren sind für klinische Studien nicht zugelassen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung der MSZ ebenfalls mit den standardisierten Differenzierungs-Kulturmedien mit Zugabe der Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Darüber hinaus wurde erstmals ein Biomaterial entwickelt, das die Stammzellen zur spontanen chondrogenen Differenzierung anregt. Das Biomaterial kann später für klinische Studien in Hinblick auf die Differenzierung der Zellen ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren eine relevante Bedeutung darstellen.

Aufbau von Ko-Kulturen

Im Rahmen der Arbeit erfolgte der Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts *in*

vitro. Zur Spezifizierung des Konstrukts ist es hilfreich, die jeweilige *in vivo* Situation des Gewebes, das nachgebaut werden soll, zu betrachten. Daraus leiten sich Konsequenzen für den Aufbau eines Meniskuskonstrukts ab, welches aus einer Ko-Kultur von Endothelzellen mit Meniskuszellen bzw. Stammzellen als Alternative bestehen soll.

Im Tissue Engineering werden vermehrt Ko-Kulturen aufgebaut und untersucht, um die *in vivo* Situation komplexer Gewebe möglichst exakt nachzubilden und die zelluläre Kommunikation, sowie Signaltransduktion im Modell zu realisieren (Schanz et al., 2010). Der Aufbau eines Ko-Kultursystems ist eines der aussagekräftigsten Modelle, aber auch voller technischer Probleme, die gelöst werden müssen, bevor funktionelle Daten erarbeitet werden können (Kirkpatrick et al., 2002).

Es wurden viele *in vitro* Mono-Kulturen entwickelt, bei denen die Reaktionen einzelner Zellen auf unterschiedliche Reize studiert wurden und es ist viel darüber bekannt, wie diese eine einzelne Zellpopulation als Ganzes beeinflusst. Aktuelle Studien, die 2D und 3D Ko-Kulturen aufbauen, haben sich zum Ziel gesetzt, mehr über die Relevanz und den Einfluss des direkten Zellkontakts zwischen zwei unterschiedlichen Zelltypen zu erfahren. Andere sind an den löslichen Stoffen im Kulturmedium, die von einer Zelle abgegeben und von einer Nachbarzelle aufgenommen werden interessiert und betrachten den Einfluss dieser Stoffe auf die Zellfunktion, die Genexpression und Angiogenese, bei der vorhandene Blutgefäße durch Proliferation und Migration von Endothelzellen weiter wachsen (Kirkpatrick et al., 2011).

Bei der Kultivierung mehrerer Zelltypen in einem Kulturgefäß müssen einige Parameter beachtet werden, die solche Systeme komplex werden lassen. Entscheidend ist zum einen die Wahl über die Zelltypen, die zuvor getrennt voneinander isoliert und charakterisiert werden müssen. Zum anderen muss die Zellzahl bzw. das Verhältnis der Zellen zueinander bestimmt werden. In der Mono-Kultur hat jeder Zelltyp ein spezifisches Nährmedium. Werden zwei oder mehrere Zelltypen in einem System ko-kultiviert, muss das Kulturmedium neu definiert werden (Kirkpatrick et al., 2011).

Zellen haben je nach Gewebeherkunft bei der *in vitro* Kultur andere Ansprüche an die Trägermatrix bezüglich der Bestandteile, Form und mechanischen Beanspruchung. Manche Zelltypen verlangen eine 2D Struktur, andere eine 3D Matrix. Weitere Einflüsse auf Zellen sind dynamische Reize, wie beispielsweise der Blutfluss in den Gefäßen oder die Kompressionskräfte auf den Knorpel. Diese Reize, die die Zellen aus ihrer *in vivo* Situation kennen, sollten *in vitro* durch statische oder dynamische Kultivierung berücksichtigt und so weit als möglich wiedergespiegelt werden. Je nach Zelltyp können diese verschieden sein, was eine große Herausforderung für den Aufbau von Ko-Kulturen *in vitro* darstellt. Dennoch ist die zelluläre Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zelltypen von großer Bedeutung und führt zu einer ansteigenden Interesse, komplexe Ko-Kultursysteme aufzubauen (Kirkpatrick et al., 2007).

In einer Studie konnte deutlich demonstriert werden, dass die Präsenz von humanen Osteo-

blasten die Zellproliferation, Differenzierung und Neubildung von Blutgefäßen von humanen Nabelschnurendothelzellen unterstützt. Die zwei Zelltypen wurden dafür auf einer 3D Trägermatrix aus Polyurethan ko-kultiviert (Hofmann et al., 2008).

Eine andere Arbeit beschreibt die Ko-Kultur humaner Osteoblasten mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Es konnte eine VEGF Produktion der Osteoblasten sowie eine positive Expression des Markers Connexin43 zwischen den beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Connexin43 ist ein Transmembranprotein, welches Zell-Zell Kanäle (gap junctions) bildet, über die ein direkter Austausch von Molekülen zwischen benachbarten Zellen möglich ist. Diese Art der Kommunikation deutet auf funktionelles Verhalten der Zellen, welches nur in Ko-Kulturen realisiert werden konnte (Santos et al., 2009).

Die Kultivierung der aus Meniskusgewebe isolierten Zellen und aus Hautbiopsaten gewonnenen mikrovaskulären Endothelzellen in getrennten Kulturgefäßen zeigten nach 12 Tagen ihre zelltypische Morphologie. Es erfolgten Versuche, die beiden isolierten Zelltypen zusammen zu kultivieren, um den Einfluss der Zellen zu beobachten. Ko-Kulturen wurden auf einer PET Membran sowie einem kollagenbasierten Zellträger etabliert um im zweiten Schritt den Einfluss des Biomaterials auf die Zellen zu analysieren. Bislang erfolgte der Aufbau von Ko-Kulturen mit Endothelzellen und Meniskuszellen ausschließlich auf synthetischen Membranen (Hoberg et al., 2009).

Es konnte in den Ko-Kulturvorversuchen, unabhängig von der Trägerstruktur (PET oder kollagenbasierte CCC Membran), eine erhöhte VEGF Ausschüttung in den Mono-Kulturen der MZ festgestellt werden. Dies kann damit begründet werden, dass die Zellen nicht genug Sauerstoff durch Diffusion erhalten, was in diesem Fall die Zellen zur Produktion von Hypoxie-induzierte Faktoren anregt (Shweiki et al., 1992). Außerdem zeigt eine Hochregulierung des Endothelzellfaktors bei Absenz von hmvEZ, dass die hMZ diese durch die erhöhte Ausschüttung von VEGF anlocken wollen, was dem natürlichen Vorbild eines Meniskus, der vaskularisiert ist entspricht. In den Ko-Kulturen zeigt sich dagegen durch eine reduzierte VEGF Expression das Verhalten nicht. Dies beweist, dass die Endothelzellen zur Versorgung der Meniskuszellen beitragen und für dessen Beibehaltung ihres typischen Zellcharakters *in vitro* eine wesentliche Rolle spielen. Die Intensität der VEGF Expression in den Ko-Kultursystemen auf CCC Membranen ist darüber hinaus am ehesten mit der *in vivo* Situation im Gewebe zu vergleichen (vgl. Abbildung 5.8 mit 5.1).

Bei den mono-kultivierten hMZ auf einer PET Membran konnte eine Ko-Expression der beiden Transkriptionsfaktoren RunX2 und Sox9 von über 90% beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde bislang nur bei Vorläuferzellen während ihrer mesenchymalen Kondensation beschrieben, wenn die Zellen noch nicht in Chondrozyten oder Osteoblasten differenziert sind (Day et al., 2005). In späteren Differenzierungsstadien supprimieren sich die untersuchten Faktoren Sox9 und RunX2 gegenseitig, um Knorpel- oder Knochentyp zu bleiben (Day et al., 2005; Dy

et al., 2012). Eine Synthese der beiden Faktoren geringerer Extension konnte in der Ko-Kultur der hMZ mit hmvEZ auf der synthetischen PET Membran nachgewiesen werden, wobei auch hier beide Marker exprimiert waren. Die Ko-Kulturen auf Fibronektin-beschichteten CCC Membranen zeigten ein schwaches Signal für RunX2 und keine Sox9-positive MZ, was bedeutet, dass die Meniskuszellen sich in ihrem Differenzierungsstatus befinden und nicht dedifferenziert sind. RunX2 ist ein meniskustypischer Marker, dessen Expression ebenfalls im Gewebe zu finden ist. Sox9 hingegen lässt sich im Meniskus nicht finden.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen zusammenfassend einen positiven Einfluss der Scaffoldkomposition auf den Differenzierungsstatus der kultivierten Zellen. Dies bedeutet, damit isolierte primäre Meniskuszellen in der Kultur ihre Funktionalität behalten, ist die Bereitstellung einer möglichst *in vivo* ähnlichen Mikroumgebung wichtig. Dazu gehört neben dem Aufbau einer Ko-Kultur die Verwendung einer geeigneten 3D Kollagen Matrix, sowie die Gewährleistung der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Durch die Realisierung dieser wichtigen Eigenschaften können langfristig funktionelle Gewebemodelle kultiviert werden.

6.3 Entwicklung geeigneter 3D Trägerstrukturen

Zunächst erfolgte die Evaluation eines geeigneten Biomaterials, um die primären MZ und MSZ in eine natürliche Umgebung zu versetzen. Viele Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass Zellen *in vitro* ihre Charakteristika in einer 3D Umgebung besser erhalten, als in einer 2D Kulturumgebung (Reboredo et al., 2013). Da es durch die Unterschiede der vorhandenen Gewebe kein optimales Trägermaterial für alle gibt, erfolgt die Auswahl des Biomaterials gewebe- bzw. zellspezifisch.

Auf Basis der Kenntnisse, dass Meniskusgewebe neben Wasser hauptsächlich aus Kollagenen besteht, vornehmlich Kollagen Typ I, erfolgte die Matrixauswahl mit sechs kollagenbasierten Scaffolds. Hierbei wurden die unterschiedlichen Trägerstrukturen mit MZ unterschiedlicher Zelldichte besiedelt und nach 7 Tagen in Kultur auf Zellwachstum und -migration untersucht. Die besten Besiedelungsergebnisse konnten mit einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in einem 1 ml Kollagen Typ I Hydrogel erreicht werden, während bei den anderen Trägermatrices die Besiedelung als Zellmonolayer auf der Scaffoldoberfläche und keine Migration der Zellen in das Innere der Matrix erfolgte. Weitere Vorteile des Hydrogels sind die schnelle Matrixumsetzung der Zellen, die leichte Handhabbarkeit, die Eigenschaft das Gel leicht modellieren zu können und somit für die klinische Anwendung gut anpassbar ist. Das Hydrogel wird bereits unter GMP Richtlinien hergestellt, wird als Produkt ChondroFiller von der Firma Amedix (Esslingen, D)

betrieben und findet klinischen Einsatz im Knorpelregenerationsbereich. Dies hat Vorteile, das Kollagen Hydrogel als Biomaterial für ein Implantat zu verwenden. Jedoch müssen die unterschiedlich verwendeten Spezies beachtet werden. Das Kollagen wird aus Rattenschwänzen isoliert und später zum Konstruktaufbau mit humanen bzw. porcinen Zellen besiedelt. Es muss gewährleistet sein, um Fremdkörperreaktionen ausschließen zu können, dass das Kollagen nach der Aufarbeitung zellfrei ist, was in Kontrollen von nichtbesiedelten Kollagen-Gelen nachgewiesen wurde.

Zur Auswahl eines geeigneten Biomaterials für die MSZ erfolgten ebenfalls Vorversuche mit insgesamt sechs unterschiedlichen Trägermaterialien und verschiedenen Zelldichten. Die beste Zellmigration und Integration wurde für die MSZ auf den elektrogenesponnenen Trägerstrukturen sowie im Kollagen I Hydrogel festgestellt, wobei eine erhöhte Matrixproduktion der Zellen in der Kollagen I/II ES-Matrix zu beobachten war. Dazu wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen auf eine 6 mm im Durchmesser große Matrix gegeben.

Elektrogenesponnene Kollagen I/II Scaffolds

HMSZ im Kollagen Typ I Hydrogel, als 3D Matrix wurden erfolgreich chondrogen differenziert, wobei neben der positiven Kollagen II Synthese, ein knorpelspezifischer Marker, auch Kollagen X, ein Marker für chondrogene Hypertrophie, von den Zellen exprimiert wurde (Nöth et al., 2007). Die Induktion der Zelldifferenzierung erfolgte dabei nicht über die 3D Matrixumgebung, sondern über Zugabe eines Wachstumsfaktors TGF- β 1 bzw. BMP-2. Aufgrund der bestehenden Vorarbeiten zur Stammzelldifferenzierung in Kollagen I Hydrogelen, erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung des Differenzierungspotentials der hMSZ auf elektrogenesponnenen Biomaterialien.

Die Methode des Elektrosponning erlaubt die Herstellung strukturierter Trägermaterialien unterschiedlicher Art mit spezifischen Funktionalitäten (Truong et al., 2012). Polymerlösungen werden zu Nanofaser-Scaffolds versponnen, die ein Zellwachstum neben ausreichender mechanischer Unterstützung erlauben und durch Abstimmung der Fasereigenschaften Zellreaktionen, wie z.B. Adhäsion, Proliferation und Differenzierung beeinflussen (Kai et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stammzelldifferenzierung ohne die zusätzliche Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise TGF- β in das Kulturmedium, sondern allein durch eine geeignete 3D Umgebung induziert. Es erfolgte die Entwicklung einer elektrogenesponnenen Komposit-Trägermatrix aus Kollagen Typ I und II, die mit den zuvor charakterisierten mesenchymalen Vorläuferzellen, die Differenzierungspotential aufwiesen, besiedelt.

Die Struktur der Komposit-Matrix erfolgte nach dem Vorbild eines nativen Meniskusgewebes. Dieser besteht hauptsächlich aus Kollagen I und nur zu geringen Mengen aus Kollagen II (Sweigart and Athanasiou, 2001). Das elektrogenesponnene Biomaterial wurde aus insgesamt fünf Schichten aufgebaut, die sich in der Faserausrichtung und der zu verspinnenden Kollagen-

Polymerlösung unterscheiden. Während die äußeren Schichten aus Kollagen Typ I bestehen, liegen in der Mittelschicht reine Kollagen Typ II Fasern vor. Schicht 2 und 4 stellen die Übergangsschichten zwischen den beiden äußeren Schichten und der Mittelschicht dar, wobei diese aus beiden Kollagentypen zu gleichen Teilen bestehen.

Die Meniskusoberfläche besteht aus einem Geflecht feiner Fibrillen, die keine bevorzugte Ausrichtung erkennen lassen. Darunter liegt eine Schicht lamellenartiger Kollagenfaserbündel, die sich unter verschiedenen Winkeln überkreuzen. Im zentralen Bereich des Meniskusgewebes können ausgerichtete Kollagenfaserbündel festgestellt werden, die sich in Richtung der größten Zugspannung ausrichten und parallel zueinander angeordnet sind (Petersen and Tillmann, 1998). Die Ausrichtung der Fasern in der entwickelten Matrix sollen die *in vivo* Anatomie widerspiegeln, während nicht ausgerichtete Kollagen I Fasern in den äußeren Bereichen die parallel angeordneten Kollagen II Fasern in der mittleren Schicht einschließen. Die Faserausrichtung konnte mit Hilfe der Rotationsgeschwindigkeit der Kollektorwelle eingestellt werden. Mit 1500 rpm wurden nicht ausgerichtete und mit 3000 rpm ausgerichtete Fasern erzielt. Es wurden Durchmesser der Kollagen II Fasern von ca. 200 nm erreicht, was der Fasergröße im nativen Gelenkknorpel entspricht. Der Durchmesser ist dabei höher, als der der Kollagen I Fasern mit weniger als 100 nm, wobei dies auf die höher konzentrierte Kollagen II Polymerlösung und damit auf eine höhere Viskosität zurückzuführen ist. Die Kollagen II Fasern sind enger zusammen gelagert, sodass weniger Hohl- und Zwischenräume zwischen den versponnenen Fasern resultieren. Zudem trägt die parallele Faserausrichtung zu einer dichteren und weniger porösen Matrix bei.

Zur Stabilisierung der Kollagenschichten erfolgten Versuche mit vier unterschiedlichen Vernetzungszeiten mit dem Crosslinker HMDI, der in der Konzentration von 10% in Isopropanol verwendet wurde. Es war bekannt, dass die verwendeten Kollagentypen jeweils eine unterschiedliche Quervernetzungsdauer benötigen (Schürlein, 2011). Während in vorhergehenden Arbeiten elektrogewebene Trägermatrices aus Kollagen Typ I Fasern 1h gecrosslinkt wurden, dauerte der Crosslinkprozess für Matrices die aus reinen Kollagen Typ II Fasern bestehen 4h (Li et al., 2005; Schürlein, 2011). Daher erfolgte eine Versuchsreihe, Kol I/II ES-Matrices 1h, 2h, 3h und 4h lang quervernetzen. In Vorarbeiten erfolgten Versuche die Kollagen I/II ES-Matrix mit weiteren Vernetzern, wie Glutaraldehyd oder dem nicht zelltoxischen Quervernetzer 1 Ethyl 3(3dimethylaminopropyl)carbodiimid zu stabilisieren (Schwab, 2013). Jedoch waren die Ergebnisse dabei nicht vielversprechend, da die Scaffolds eine starke Kontraktion sowie ein Verschmelzen der Fasern aufwiesen. Somit wurden die Zellversuche im Rahmen dieser Arbeit mit dem Crosslinker HMDI durchgeführt. HMDI bindet Rückstände von Lysin oder Hydroxylysin und wird überwiegend für kollagenbasierte Biomaterialien verwendet (McKenna et al., 2012). Permacol[®], von der Firma Covidien (IRL) ist ein biologisches Implantat aus dermalemem Schweinekollagen und wird beispielsweise zur Rekonstruktion in der Thoraxchirurgie,

zur laparoskopischen Versorgung eines großen Narbenbruchs oder als partieller Zwerchfellersatz eingesetzt (Anegg et al., 2011). Es besitzt spezielle Eigenschaften, die eine Reparatur von defekten Weichgeweben durch Integration und Gefäßneubildung bei geringem Adhäsionsrisiko ermöglichen. Das Kollagen Biomaterial wird mit HMDI quervernetzt und ist dadurch dauerhaft und stabil in seiner Struktur. Studien zeigten keinen Unterschied der Antworten zwischen den quervernetzten und nicht quervernetzten Trägermaterialien *in vitro* und *in vivo* (Cornwell et al., 2009; Ashwin et al., 2012; Cavallo et al., 2013).

Die Zellviabilität der quervernetzten Scaffolds auf mesenchymale Stammzellen wurde mittels dem WST-1 Test untersucht und es konnte keine toxische Wirkung analysiert werden (Schwab, 2013). Dies wurde auch in den erfolgten Zellversuchen belegt, bei denen vitale Stammzellen auf der ES-Matrix mit der Lebend-Tot-Färbung nachgewiesen wurden, die proliferieren und differenzieren.

Differenzierungsverhalten von MSZ auf Kol I/II ES-Matrices

Die Interaktion der humanen mesenchymalen Stammzellen mit der Kol I/II ES-Matrix wurde histologisch, immunhistologisch und auf Proteinebene untersucht.

Es gibt zahlreiche Entwicklungen von Trägerstrukturen, die sich beispielsweise im Rohmaterial, der Form, Beschaffenheit, Festigkeit, Porengröße, Oberflächentopografie, -beschichtung und -funktionalisierung unterscheiden. Je nach Anwendungsgebiet sind diese Faktoren zellspezifisch zu bestimmen, um eine optimale Besiedelung mit Zellen *in vitro* zu generieren. Einige 3D Biomaterialien, die entwickelt werden, erlauben keine Migration der Zellen ins Innere und weisen stattdessen nur ein Besiedeln an deren Oberflächen auf, wie auch in dieser Arbeit bei der Auswahl der Biomaterialien gezeigt wurde. Eine Zellmigration in die bereitstehende Trägerstruktur ist notwendig, um Gewebekonstrukte entwickeln zu können. Natives Gewebe, bei dem eine homogene Anordnung der Zellen in ihrer EZM nachzuweisen ist, gelten dabei als Vorbild. Wachsen Zellen in Schichten neben- oder übereinander, entspricht das nicht der natürlichen Gewebestruktur und ist artifiziell, was zu einer veränderten Zellkommunikation und einem veränderten Zellverhalten führt. Zu beachten bei der Biomaterialauswahl und -entwicklung, um mit lebenden Zellen ein funktionelles Gewebe zu erreichen, ist zum einen die Degradierbarkeit des Materials (Stevens and George, 2005). Zellen benötigen für die Besiedelung und Einwanderung in eine Matrix und weiter für einen eventuellen Umbau der gegebenen Trägerstruktur bis zur Produktion der eigenen EZM eine bestimmte Zeit. In diesem Zeitraum sollte die Matrix ein stabiles Trägerkonstrukt für die Zellen sein. Zum Anderen spielt die Aktivierung der spezifischen Zell-Materialinteraktionen und eine 3D Umgebung, die die EZM zu Beginn nachahmt eine wesentliche Rolle (Stevens and George, 2005). Dazu zählen auch Modifizierungstechniken von 2D Oberflächen und 3D Scaffolds mit bioaktiven Signalen, um eine spezifische Bindung zu veranlassen. Grafahrend et al. konnte beispielsweise durch kovalente Modifizierung von zell-

adhäsionsvermittelnden Peptiden an hydrophilen Fasern einer 3D elektrogewebenen Matrix eine spezifische Bioaktivierung schaffen, um damit eine Zelladhäsion zu erreichen (Grafarend et al., 2011).

Es wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die Mikrostruktur einer Oberfläche, sowie die Porengröße eines Materials ebenfalls Einfluss auf die Zellbesiedelung der Hohlräume sowie auf die Zellkommunikation nehmen (Gorgieva et al., 2014). Eigenschaften eines Biomaterials können so angepasst werden, dass gezielt Vitalität von Zellen und ihre Genotypentwicklung bestimmt werden.

Der Nachweis der Zellmigration auf den 5-schichtigen ES Matrices erfolgte mittels fluoreszenzmarkierten Stammzellen über die ersten sieben Tage. Bereits nach vier Tagen statischer Kultur der zellbesiedelten Kol I/II ES-Scaffolds konnte ein Zelleinwandern bis in das Innere der Matrix erreicht werden. Eine solche Zelleinwanderung konnte erstmals in elektrogewebenen Trägermaterialien gezeigt werden. Mit fortlaufender Kulturdauer proliferieren die Zellen auf dem Biomaterial weiter und synthetisieren Matrix. Dieses Verhalten ist vor allem in den kultivierten Proben mit Stammzellmedium MSCGM-CDr+2% FCS zu erkennen, das zudem auch in der Bestimmung des DNA Gehalts belegt wurde. Die Proliferation im chondrogenen Differenzierungsmedium fällt dabei geringer aus. Dies ist damit begründet, dass das verwendete Medium nicht zur Proliferation der Zellen anregt, sondern zur Differenzierung der Zellen. Die Zusätze für das chondrogene Differenzierungsmedium sind aus der Literatur bekannt und dementsprechend gewählt und verwendet worden (Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Noth et al., 2002; Nöth et al., 2007). Eine Differenzierung der hMSZ in Chondrozyten lässt sich zum einen mit der GAG Messung belegen (Kock et al., 2013). Wird die gemessene GAG-Menge auf den DNA Gehalt einer Probe normiert, so lässt sich eine ansteigende GAG Zunahme der Zellen über die gesamte Kulturdauer von 21 Tagen im chondrogenen Medium erkennen. Der Anteil GAG pro DNA der Proben in MSCGM-CDr+2% FCS Medium verzeichnet hingegen eine leichte Abnahme über die Zeit. Diese Reduzierung kann mit der signifikant hohen Zellproliferation in diesem Medium begründet werden. Beachtenswert ist in diesem Medium allerdings, dass der GAG Anteil der Proben über die Zeit steigt. Was bedeutet, dass die Zellen nicht aufgrund des Mediums differenzieren, sondern das bereitstehende Biomaterial die Zelldifferenzierung anregt. Diese Beobachtung wurde weiter nachgeforscht und in der Histologie und Proteinchemie untersucht.

Mesenchymale, aus dem Knochenmark isolierte Stammzellen fanden bereits in anderen Arbeiten ihren Einsatz als Unterstützung der Meniskusheilung. Angele et al. besiedelte Komposit-Matrices aus Hyaluronsäure und Gelatine mit MSZ und kultivierte das zellbesiedelte Konstrukt in chondrogenem Differenzierungsmedium vor, bevor es in Kaninchen implantiert wurde. Das Implantat zeigte nach drei Monaten einen erhöhten Anteil an meniskustypischem Faserknorpel, was zum einen durch die passende Umgebung für die Zellen durch das Komposit-Scaffold

induziert wurde. Zum anderen sind die Zellen bereits in einer Knorpelmatrix eingebettet und synthetisieren Knorpelgewebe, das das Implantat gegen biomechanische Kräfte vor Ort stabilisiert (Angele et al., 2008). In einer weiteren Studie wurden Fibrinclots mit und ohne Stammzellen in eine operativ hergestellte Meniskusverletzung im avaskulären Bereich eingefügt und deren Heilungsfähigkeiten analysiert. Allerdings konnte hierbei keine verbesserte Heilung durch die Zugabe der Stammzellen im Clot erreicht werden (Port et al., 1996). Dies kann durch einen mangelnden Differenzierungsimpuls der Zellen, sei es über eine geeignete Trägerstruktur oder mit Wachstumsfaktoren im Medium begründet sein. Murphy et al. konnte hingegen durch eine Injektion von Stammzellen in Hyaluronsäure in ein Kniegelenk nach einer Meniskektomie einen positiven Effekt für die Meniskusregeneration beschreiben, was wiederum das Potential von Stammzellen für die Heilung von Meniskusdefekten unterstützt (Angele et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte die Differenzierung von Stammzellen in Chondrozyten durch ein strukturiertes Biomaterial induziert werden. Durch die Kombination von Kollagen Typ I und II, die unterschiedliche Ausrichtung und Porengröße der Fasern sowie der schichtweise Aufbau der Matrix begünstigt die Zellen, einzuwandern und durch die geeignete Mikroumgebung sich in ein spezifisches Zellphänotyp, den Fibrochondrozyt zu differenzieren. Die Experimente zeigten unabhängig der Vernetzungsdauer der Scaffolds keinen Unterschied auf das Wachstum, die Einwanderung und Differenzierung der hMSZ. Die Zelldifferenzierung wurde in der Immunhistologie sowie auf Proteinebene mittels PCR Analyse bestätigt und lassen sich in allen vier verwendeten Medien feststellen. Knorpelspezifische Marker, wie Aggrekan und Kol II zeigen in gewissen Bereichen der Matrix eine positive Färbung, die über die untersuchte Zeit zunimmt. Ebenso deutet die Blaufärbung der Zellmatrix in der Alcianblau Färbung auf die Produktion von sauren Proteoglykane hin, die wichtige Bestandteile der Knorpelmatrix sind (Schinagl et al., 1997; Nguyen et al., 2011). Eine stärkste Blaufärbung zeigte sich in der Probe im chondrogenen Medium mit TGF- β , äquivalent zu den immunhistologischen Färbungen gegen Kollagen I, II und Aggrekan. Die Färbung der besiedelten Scaffolds mit dem Transkriptionsfaktor Sox9, der die Chondrogenese von Stammzellen induziert und somit als Marker für chondrogene Progenitorzellen gilt, zeigte keine Expression. Dies bedeutet, dass sich die Zellen auf dem Biomaterial bereits nach 14 Tagen Kultur in einem vorgeschrittenen Differenzierungsstadium befinden. Zur weiteren Einordnung des Differenzierungsstadiums der Zellen erfolgten zusätzlich Färbungen mit dem Antikörper RunX2, ein Transkriptionsfaktor der mit Osteoblastendifferenzierung assoziiert wird und ein Marker für hypertrophe Chondrozyten darstellt. Die Hochregulierung von RunX2 synthetisiert Kollagen Typ X, der in der kalzifizierten Knorpelzone vorkommt und ein meniskusspezifischer Kollagentyp darstellt (Day et al., 2005; Akiyama, 2008; Zuscik et al., 2008). Zudem wird die VEGF Konzentration erhöht, was zur Stimulation von Angiogenese beiträgt und zum Einwachsen von Blutgefäßen führt, indem Endothelzellen aktiviert werden (Pufe et al., 2005). Die Untersuchungen der zellbesiedelten Kol I/II ES-Matrices gegen RunX2

und Kollagen X resultierte in einer positiven Rotfärbung unabhängig vom Medium, in dem kultiviert wurde. Eine durchgehend positive Kol X Expression über die gesamte Kulturdauer in allen Medien konnte auch in der PCR nachgewiesen werden. Die Expression des Markers Kol I, ein Matrixprotein aus welchem der Meniskus hauptsächlich besteht, war ebenfalls positiv und mit dem Housekeeping-Gen Ef1 α vergleichbar, während in der Immunhistologie die Färbeintensität von Kol I über die Zeit minimal abgenommen hat.

Neben einem geeigneten Biomaterial spielen Wachstumsfaktoren in der Zell- und Gewebeentwicklung *in vitro* und *in vivo* eine entscheidende Rolle. TGF- β führt zu einer steigenden Proteoglykan- und/oder Kollagensynthese in unterschiedlichen Tiermodellen (Webber et al., 1985; Pangborn and Athanasiou, 2005a,b).

In dieser Arbeit erfolgte eine quantitative Messung der Zellzahl und des Proteoglykangehalts der MSZ auf den Kol I/II ES-Matrices. In dem Wachstumsmedium sowie in dem chondrogenen Differenzierungsmedium konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Zellzahl und des Proteoglykangehalts über die untersuchte Zeit von 21 Tagen nachgewiesen werden. Pabbruwe et al. konnten durch Zugabe von TGF- β als Differenzierungsfaktor für MSZ keine Verbesserung der Integration von Meniskusgewebe, sondern eine Hemmung des Prozesses beobachten (Pabbruwe et al., 2010). Dies bedeutet, dass Stammzellen, die in Wachstumsmedium kultiviert werden, bessere Heilungschancen haben als vordifferenzierte Zellen. Aufgrund der Tatsache, die Zellen über die gegebene Matrix und nicht über zusätzliche Wachstumsfaktoren differenzieren zu können, hat die entwickelte Matrix eine relevante Bedeutung für die Verwendung in klinischen Studien.

Die alternative Zellquelle zu chondrogen differenzierte MSZ sind primäre Chondrozyten. Es gibt allerdings Beobachtungen, dass aus Knorpelgewebe isolierte Chondrozyten und Meniskuszellen eine verlangsamte Integrationsfähigkeit zeigen (Pabbruwe et al., 2010). Zudem sind Chondrozyten nur begrenzt in einem Organismus vorhanden und es muss ein gesundes Stück Knorpel für deren Isolation explantiert werden.

Ein optimales Implantat für Knorpel- oder Meniskusschäden würde demnach aus einem geeigneten Biomaterial aufgebaut sein, das für undifferenzierte Stammzellen die optimale Mikroumgebung darstellt und über eine ausreichend mechanische Festigkeit verfügt, die Druckkräften vor Ort standhält.

Durch die Kombination von MSZ auf Kol I/II ES-Matrices, welche in MSCGM-CDr+2% FCS Medium kultiviert wurden, konnte erstmals eine tiefe Integration in die Matrix und weiter ohne die Zugabe eines Wachstumsfaktors eine spontan chondrogene Differenzierung der Zellen nachgewiesen werden. Dieses Konstrukt in dieser Kombination könnte die Heilungschancen eines Knorpeldefekts verbessern und ist eine mögliche Alternative für die Knorpelregeneration. Zur Eignung der Kol I/II ES-Matrices als Implantat müssen allerdings noch mechanische Tests durchgeführt werden, um deren Festigkeit zu prüfen.

6.4 Aufbau eines vaskularisierten 3D Meniskuskonstrukts

Für die Entwicklung eines klinisch relevanten Implantats ist neben der Bereitstellung einer geeigneten Matrix die Vaskularisierung von großer Bedeutung (Liu et al., 2012b). Zum einen für die Nährstoffversorgung des Konstrukts und zum anderen für die Anbindung des Konstrukts an den Organismus, um die Weiterversorgung direkt nach der Implantation gewährleisten zu können. Rouwkema et al. konnten zeigen, dass humane Nabelschnurendothelzellen fähig dazu sind, in einem *in vitro* gezüchteten Knochengewebe ein 3-dimensionales prevaskuläres Netzwerk auszubilden (Rouwkema et al., 2006).

Durch die Kombination zweier Trägerstrukturen, der BioVaSc[®]-Matrix und dem Kollagen Hydrogel, konnte ein vaskularisiertes 3D Meniskuskonstrukt aufgebaut werden. Beginnend mit der Anordnung, respektive des natürlichen Aufbaus eines Meniskus, die Blutgefäße im äußeren Bereich zu lokalisieren und im inneren Drittel ein avaskuläres Knorpelgewebe aufzubauen, die zum optimalen Zell-Matrix-Verhältnis verhalf. Durch die Auswanderung von MZ aus dem Kollagen Hydrogel in die Submucosa der BioVaSc[®] und deren Matrixbildung erfolgte ein Verbund der beiden Biomaterialien zu einem Gewebekonstrukt. Dennoch trennte sich zu ca. 60% der Ansätze das Hydrogel während des Schneidens und Färbens durch Artefakte von der Matrix. Ein weiterer Vorteil der BioVaSc[®]-Matrix ist die Erhaltung des arteriellen und venösen Anschlusses, über die das Konstrukt bei einer Implantation an den körpereigenen Blutkreislauf angeschlossen werden kann. Ein solches Ko-Kultursystem wurde erstmals in einer Dimension von ca. 27 mm Breite, 35 mm Länge und 10 mm Höhe unter dynamischen Kulturbedingungen, wie die Berücksichtigung der Scherbeanspruchung der mvEZ in den Gefäßstrukturen aufgebaut. Die Verwendung der BioVaSc[®] erlaubt sowohl die physiologische Versorgung der Zellen über ein Gefäßsystem als auch eine neuartige, vaskularisierte Matrixhülle für eine mit MZ beladenen Kollagenmatrix. Die aufgebauten 3D Meniskusersatzgewebe hatten eine vergleichbare Dimension mit einem ausgewachsenen, nativen humanen Meniskus. Die durchschnittliche Breite eines lateralen Meniskus eines Mannes beträgt 30,7 mm (Standardabweichung [SD]=3,5), die Länge beträgt 33,7 mm (SD=4,3) (Yoon et al., 2011). Abbildung 6.1 zeigt ein Beispiel eines 3D Meniskuskonstrukts in seiner Größe, dessen Breite ca. 27 mm und die Länge ca. 35 mm beträgt. Zusätzlich ist im Bild das Gefäß- und Kapillarsystem der BioVaSc[®] grün angefärbt.

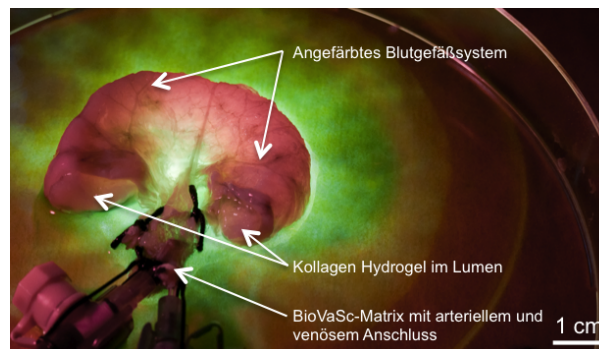


Abbildung 6.1: 3D Meniskuskonstrukt mit angefärbtem Blutgefäßsystem.

Die primären mikrovaskulären Endothelzellen, die aus der Dermis isoliert wurden, können für die erfolgreiche Rebesiedelung der zuvor azellularisierten Gefäße eingesetzt werden. Es konnten nach insgesamt 21 Tagen Kulturdauer in vier von fünf Versuchen vitale Zellen in den Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] beobachtet werden. Dies wurde sichtbar durch die Umsetzung der Zellen des gelben Formazans in eine blau violette Färbung. Makroskopisch ist die erfolgreiche Rebesiedelung bis in kleinste Verästelungen zu erkennen. Bei Versuch 5 waren nur im Bereich der Gefäßanschlüsse vitale Zellen zu beobachten, während die Gefäßstrukturen des Lumens nicht mit Zellen rebesiedelt wurden. Da die BioVaSc[®] eine natürliche Matrix darstellt, die aus unterschiedlichen Spendertieren explantiert wird kann es zu Spenderabhängigkeiten kommen. Geringe Abweichungen in Struktur, Qualität und Größe sind unvermeidbar. Obwohl sie mit demselben Protokoll azellularisiert werden, können Unterschiede in der Erhaltung der Gefäßstrukturen vorkommen, wie beispielsweise die Menge des Rückflusses, die von der Dichtigkeit des Gefäßsystems abhängig ist und variieren kann.

Bei den Versuchen 1,2 und 4 wurden vitale MZ im Querschnitt des gesamten Hydrogels nachgewiesen, während in Versuch 3 die Intensität der Blaufärbung zurückging und nur am äußeren Rand des Hydrogels und in Versuch 5 keinerlei Blaufärbung zu erkennen war. Diese Tatsache beweist, dass die mvEZ eine wichtige Rolle bei der Versorgung der MZ durch den Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen im Lumeninneren übernehmen. Versuch 5, bei dem keine erfolgreiche Rebesiedelung des Gefäßsystems im Lumen erfolgte, überlebten die MZ im Gel durch mangelnde Nährstoffversorgung nicht. So auch in Versuch 3 zu erkennen, bei diesem vitale mvEZ nur in den Hauptgefäßen zu finden sind und damit die Versorgung nicht für das gesamte zellbesiedelte Hydrogel ausreicht, sondern ausschließlich die MZ im Randbereich und nicht die tiefer liegenden Zellen ausreichend versorgt werden. Bedingt durch die kritische Größe des Konstrukts, dessen Breite und Länge jeweils zwischen 20 und 35 mm und dessen Höhe ca. 10 mm beträgt, ist eine Vaskularisierung notwendig, da Zellen in einem Gewebekonstrukt mit einer Tiefe größer als 8 mm durch Diffusion nicht überleben können (Wallis et al., 2003).

Die selbe Situation wurde auch in den statischen Kontrollen beobachtet. In einem mit MZ besiedelten Kollagen-Typ-I Hydrogel, welches in einem Stück BioVaSc[®] ohne Rebesiedelung mit mvEZ kultiviert wurde, ließen sich ebenfalls keine vitalen Zellen im Gel nachweisen. Wurde das zellbeladene Hydrogel in einem Falcon statisch kultiviert, konnten nur die MZ, die direkt mit dem Nährstoffmedium in Kontakt waren, überleben. Das Sterben von primären Zellen in der statischen Mono-Kultur ohne Vaskularisierung konnte auch in der Kultur anderer 3D Biomaterialien, beispielsweise einem Komposit-Scaffold aus Kol I und II, gezeigt werden. Vitale hMSZ im Scaffoldinneren zeigten sich ausschließlich unter dynamischen Kulturbedingungen eines pulsatilen Flusses und einer erfolgreich rebesiedelten BioVaSc[®] mit hmvEZ (Schwab, 2013).

Das Kollagen I Hydrogel war nach der gesamten Kulturdauer mit der umliegenden BioVaSc[®]-Matrix zusammengewachsen und bildeten eine Einheit. Die Verbindung lässt sich durch die Einwanderung der MZ in die Krypten und maximal bis zur Lamina muscularis der Darmmatrix beweisen. Nach der Kulturdauer von drei Wochen war eine dreidimensionale gewebeartige Masse im Lumen zu erkennen. Das Hydrogel hat im Vergleich zu Versuchsbeginn an Festigkeit zugenommen. Bei erfolgreicher Rebesiedelung erhalten die Endothelzellen unter dynamischen Kulturbedingungen eines pulsatilen Flusses ihre zelltypischen Marker, wie z.B. vWF, ein Glykoprotein im Blut, das bei der Hämostase eine wichtige Rolle spielt. Durch die Entwicklung von kleinsten Gefäßstrukturen in der Darmwand der BioVaSc[®], die in den immunhistologischen Analysen und im MTT Test gezeigt sind, kann eine für das Meniskusgewebe typische Reorganisation der Zellen belegt werden. Durch die Kommunikation der Meniskuszellen mit Endothelzellen, können diese zur Neovaskularisation induziert werden. Der Vorgang der Gefäßneubildung ist mit einer lokalen Überproduktion des Endothel Wachstumsfaktors VEGF assoziiert, welches von den Meniskuszellen gebildet wird und einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Neoangiogenese ist (Adair and Montani, 2010).

Es gibt Untersuchungen, die Ausbildung von tubulären Strukturen von Endothelzellen *in vitro* unter hypoxischen Bedingungen zu verbessern (Duyndam et al., 2006). Weiter können Hypoxie-induzierbare Faktoren die VEGF Genexpression in hypoxischen Geweben aktivieren (Kelly et al., 2003). Durch das Fehlen eines Luftfilters im Bioreaktorsystem, erfolgte während der gesamten Kulturdauer kein Gasaustausch mit der Umgebungsluft, die aus rund 20% Sauerstoff besteht. Zu vermuten ist daher ein geringerer Sauerstoffgehalt im Glasbioreaktor, der zu der Gefäßneubildung beitragen könnte. Dies sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, um eine eventuelle auftretende Hypoxie nachzuweisen, die Auswirkung auf die Vitalität und Charakterisierung der Zellen hat. Im Hydrogel, welches im Lumen der BioVaSc[®] vorliegt, sind die Meniskuszellen in einer 3D Kollagenmatrix eingeschlossen. Durch die EZM der BioVaSc[®] im äußeren Bereich ist das Konstrukt abgeschlossen und Nährstoffe können ausschließlich durch Diffusion ins Innere eindringen. Es ist bekannt, dass hypoxische Kulturbedingungen die *in vitro*

Kultur von Chondrozyten begünstigen, deren Überlebensrate und Proliferationsrate steigern und der Dedifferenzierung entgegenwirken (Schroback et al., 2012).

Die immunhistochemische Analyse der Meniskuszellen im Gel zeigte, neben der positiven VEGF Expression im äußeren Bereich des 3D Ko-Kulturkonstrukts, eine RunX2 und Kollagen X Synthese. RunX2 trägt über die Chondrozyten Hypertrophie und dem Matrixabbau zur Kniegelenkarthrose bei (Kamekura et al., 2006). Kollagen X ist ein meniskuspezifischer Marker, der ebenfalls im Stadium der Hypertrophie von Chondrozyten eine Rolle spielt. Das Meniskusgewebe ist nicht mit dem hyalinen Knorpel gleichzusetzen. Während die Chondroblasten eines hyalinen Knorpels die typischen knorpelzellspezifischen Marker wie Sox9, Kollagen II und Aggrecan exprimieren, sind Fibrochondrozyten im Meniskusgewebe typischerweise mit hypertrophen Chondrozyten zu vergleichen, die eine erhöhte Expression von Kollagen I und Kollagen X aufweisen (Verdonk et al., 2005).

Die Produktion saurer Proteoglykane der Meniskuszellen im aufgebauten Konstrukt konnten mittels der Alcianblau Färbung nachgewiesen werden. In den Bildern der Immunhistologie des nativen Meniskuskontrollgewebes sind die Proteoglykane in der Pentachrom Färbung deutlich blau angefärbt, vor allem im inneren Drittel. Eine deutliche Gelbfärbung des Positivgewebes im mittleren Drittel kann in der Pentachrom Färbung festgestellt werden, was auf fibrogenes Gewebe zurückzuführen ist. Die Fibrose, als Folge einer Verhärtung des Bindegewebes blieb im nachgebauten 3D Meniskuskonstrukt aus. Für das Erreichen ist beispielsweise die mechanische Stimulation des gezüchteten Gewebes mit einem speziell angefertigten Bioreaktor eine mögliche Lösung.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Bioreaktor könnte dafür in zukünftigen Experimenten genutzt werden. Durch Kompressionskräfte könnten die Kollagenfasern im Hydrogel verdichtet werden, wobei eine Verhärtung des Gewebes die Folge sein kann. Jedoch stellt sich die Frage, ob der Aufwand einer dynamischen Kultur wirklich notwendig ist. Die Entwicklung eines Bioreaktors, sowie die Kultivierung des Implantats damit sind kosten- und zeitintensiv. Für die Implantatherstellung unter GMP Richtlinien muss deshalb geprüft werden, ob ein solches Bioreaktorsystem notwendig ist. Ergebnisse eines Großtierversuchs im Schwein oder Pferd könnten dabei entscheidend sein, um diese Fragestellung zu klären. Durchaus könnten die Bewegungen *in vivo* ausreichend sein, die Zellen in der richtigen Matixumgebung mit den noch fehlenden Stimuli zu versorgen.

Die Übertragung der humanen vaskularisierten Implantate auf das porcine Modell erfolgte als Vorbereitung für die Durchführung zulassungsrelevanter Tierversuche. Die beiden Spezies, human und porcine, mit diesen die Konstrukte aufgebaut wurden, sind im immunhistochemischen Vergleich annähernd identisch, womit die Aussagen der Ergebnisse für beide Modelle gelten. Die Markerexpressionen in der immunhistochemischen Analyse sind kaum zu unterscheiden, bis auf den Faktor VEGF, der bei dem porcinen Modell im gesamten Konstrukt nachzuweisen war,

während die VEGF Expression beim humanen Modell auf das äußere Drittel beschränkt war. Ein Grund dafür kann das Alter der isolierten Meniskuszellen sein. Die Isolation der humanen Meniskuszellen erfolgte aus nekrotischen Geweben, die porcinen Zellen wurden aus Menisken von jungen, gesunden Schweinen isoliert. Begründet mit der Tatsache, dass ein Meniskus im Kindesalter komplett vaskularisiert ist, exprimieren die juvenilen Meniskuszellen entsprechend mehr VEGF als die adulten.

Eine weitere Möglichkeit, die Fibrose einzuleiten, neben der biophysikalischen Stimulation, kann die Zugabe von spezifischen Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, beispielsweise TGF- β in das Kulturmedium, oder die Bindung dieser an das Biomaterial sein. Zum Aufbau der 3D Meniskuskonstrukte wurde zur Kultivierung Wachstumsmedium ohne Zugabe jeglicher Faktoren verwendet. Jedoch ist zu beachten, dass die Anwendung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nicht GMP tauglich und somit in Implantatherstellprozessen auszuschließen sind.

6.5 Bioreaktorentwicklung und ihre Anwendung im Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld, in dem Biologen, Chemiker, Mediziner und Ingenieurwissenschaftler eng zusammenarbeiten. Die Wichtigkeit dieses Zusammenspiels der unterschiedlichen Grundlagentheorien ist in dieser Arbeit aufgezeigt.

Die Ingenieurwissenschaft beschäftigt sich im Bereich des Tissue Engineering, neben der Entwicklung von Druckern für die Biomaterialentwicklung, größtenteils mit dem Entwickeln von Bioreaktorsystemen für die Zellkultur. Es gibt sie in den unterschiedlichsten Ausführungsformen: Spinnerflasks, Perfusionsbioreaktoren mit und ohne mechanischer Deformation, Kompressionsreaktoren, Dehnungsreaktoren, Bioreaktoren mit Zugspannung, um nur wenige Systeme zu nennen (Minuth et al., 2005; Schulz and Bader, 2007; Kahlig et al., 2013; Subramony et al., 2013). Oftmals sind die entwickelten Systeme nicht effizient und kostenintensiv. Sie benötigen zum einen oft mehr Zellkulturmedium als statische Kulturgefäße. Zum anderen muss die Handhabung solcher Systeme unter aseptischen Bedingungen, sowie die Verwendung von ausschließlich biokompatiblen und autoklavierbaren Werkstoffen bei der Entwicklung berücksichtigt werden. Systeme mit einer Komponentenanzahl, die auf ein Minimum begrenzt ist, sind für die spätere Verwendung von Vorteil.

Hansmann entwickelte PC-gesteuerte Inkubatoren mit hoher Robustheit, einer Klimaregelung, einem Temperatursensor, einem CO₂-Konzentrationsensor und integrierten Rollerpumpen (Hansmann, 2010). Kommerziell erhältliche Inkubatorschränke sind gegenüber den an

Bioreaktoren angepassten Inkubatoren von Nachteil, da keine Bereiche zur Unterbringung der elektrischen Reaktorbauteile vorgesehen sind. Zudem ist das Verbinden der Reaktoren an eine externe Strom- und Gasversorgung durch die Tür eines Inkubatorschranks nur sehr eingeschränkt möglich (Hansmann, 2010).

Für die dynamische Kultivierung der Meniskuskonstrukte wurden Perfusionsreaktoren aus Glas und die dafür angepassten Inkubatoren verwendet. Die erhaltenen Gefäßstrukturen der BioVaSc[®]-Matrix wurden unter pulsatilem Fluss mit Kulturmedium perfundiert und dabei der natürliche Blutfluss simuliert. Der Druck im Bioreaktorsystem konnte mittels eines eingebauten Druckreglers und einem Drucksensor online verfolgt werden. Durch die Nachahmung der Biologie des Gewebes mit Hilfe der Biomaterialentwicklung und durch die dynamische Kultivierung im Glasbioreaktor erfolgte die Entwicklung eines lebensgroßen, vitalen und funktionellen 3D Meniskus Ersatzgewebes. Die Endothelzellen erhalten in diesem System den nötigen Reiz ihren zelltypspezifischen Charakter beizubehalten, funktional die erhaltenen Gefäßstrukturen bis in die kleinsten Verästelungen der azellularisierten Matrix auszukleiden und Angiogenese durchzuführen. Die Endothelzellen, sowie die in Hydrogel eingebetteten Meniskuszellen im Lumeninneren blieben durch die äußere Versorgung über die gesamte Kultivierung vital. Beide Zelltypen exprimierten ihre zelltypischen Marker. Allerdings synthetisierten die MZ kein eigenes Kollagen Typ I, aus welchem der Meniskus größtenteils besteht und ein typischer Matrixbestandteil des Gewebes darstellt. Fraglich ist, ob die Funktion des verwendeten Perfusionsreaktors ausreicht, oder ob ein weiteres Bioreaktorsystem die Matrixsynthese der Meniskuszellen anregen kann. Aus diesem Grund erfolgte die Entwicklung eines neuartigen Bioreaktorsystems, mit Hilfe dessen in Zukunft die Zellen im 3D Konstrukt mit mechanischer Druckkraft und Scherspannung stimuliert werden können. Die Bioreaktorentwicklung beinhaltet die Prüfung auf Biokompatibilität, Autoklavierbarkeit sowie die Berücksichtigung einer einfachen Handhabung des Systems. Dazu wurden Materialien wie PEEK verwendet, die diese Bedingungen erfüllen und das gesamte System aus so wenig wie möglichen Einzelteilen konstruiert. Auch auf modulare Bauweise, um in Zukunft bei Gebrauch mehrere Systeme gleichzeitig anzutreiben wird Wert gelegt. Vorstellbar ist z.B. ein aneinander schalten von mehreren Reaktorsystemen, wie der hier Entwickelte über die Komponente der Welle. Zur Praktikabilität der Systeme gehört ebenfalls, dass diese platzsparend sind.

Für das zu kultivierende Implantat wurde ein Verfahrtsch konstruiert, auf dem das Meniskuskonstrukt mit einem Rahmen eingespannt werden kann. Damit soll die Fixierung der äußeren Meniskushörner, wie sie im natürlichen Kniegelenk vorzufinden ist, simuliert werden. Der Verfahrtsch ist auswechselbar, um zukünftig auch andere Proben, Gewebekonstrukte oder -modelle in dem Bioreaktorsystem kultivieren zu können. Die Probe befindet sich während der Kultur in einem abgeschlossenen Raum, der mit Medium befüllt werden kann, so dass das Konstrukt nicht trocken fällt und mit Medium versorgt ist. Ein weiterer Medienkreislauf

versorgt die Endothelzellen, die die Gefäßstrukturen auskleiden über den arteriellen Zugang und venösen Rückfluss der BioVaSc[®]-Matrix. Die Druckkraft auf das Konstrukt soll über ein pneumatischen Druckzylinder von unten bewerkstelligt werden. Dabei drückt ein verfahrbarer Stempel das auf dem Verfahrtschiff liegende Konstrukt gegen einen Mörser, der auf einer Welle über dem Verfahrtschiff befestigt ist. Durch eine Hin- und Herbewegung der Welle können gleichzeitig Scherkräfte auf das Konstrukt wirken. Die Welle ist dafür gelagert und mit einem Magnetadapter versehen, über den das System an eine Rollerpumpe des Inkubators angesteckt werden kann (siehe Abbildung 5.31 (B)). Durch die Ansteuerung der Rollerpumpe im alternierenden Modus können die Bewegungen realisiert werden.

Ein Bioreaktor, der speziell für Meniskusgewebekonstrukte oder für die Kultivierung von Meniskuszellen *in vitro* konstruiert ist, gibt es bislang nicht. Publierte Arbeiten, die Meniskus- oder Knorpelzellen dynamisch unter Kompression oder Perfusion kultivieren, verwenden Bioreaktorsysteme, wie beispielsweise ein Rührtank, ein Druckkammersystem oder eine Testmaschine mit hydrostatischem Druck (Neves et al., 2002; Natsu-Ume et al., 2005; Gunja et al., 2009). Aufderheide et al. entwickelte einen speziellen Bioreaktor, ein Kompressionsstimulator, mit diesem direkte Kompressionskräfte auf Knorpel und Meniskusgewebeexplantate appliziert werden können (Aufderheide and Athanasiou, 2006).

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Bioreaktorsystem ist trotz der wenigen Bauteile sehr komplex und kompliziert im Aufbau. Die Abmaße des Bioreaktors (200x160x160 mm) wurden so konstruiert, dass es in die dafür angepassten Inkubatoren (300x250x400 mm) passt. Ein vergleichbares System, eine dynamische Kompressionskammer von Sah et al. wurde so umgebaut, dass in diesem Knorpelkonstrukte mit zyklischem Druck belastet werden können (Sah et al., 1989). Jedoch war das umgebaute System zu groß und konnte nicht mehr in ein Inkubator eingebaut werden. Auch neuere, vergleichbare Systeme auf dem Markt, wie beispielsweise die Bioreaktorserie ElectroForce[®] BioDynamic[®] von BOSE (Eden Prairie, MN USA), das FX-5000[™] Compression System von Flexcell[®] International Cooperation (Hillsborough, NC USA) oder die Apparatur von Zwick Testing Machines (Leominster, UK) zum Erzeugen von Kompressionskräften auf in Agarose eingebettete Knorpelzellen sind komplexe Systeme und passen aufgrund ihrer Dimensionen nicht in einen Inkubatorschrank. Ebenso das Handling im praktischen Gebrauch ist von wichtiger Bedeutung. Inbetriebnahme und Wartung der Systeme müssen kosten- und zeiteffektiv durchführbar sein.

Ob das entwickelte Bioreaktorsystem wirklich notwendig ist für die Kultivierung eines Meniskusimplantats werden die geplanten Großtierversuche zeigen. Durch die Verwendung des Perfusion-Glasbioreaktors können bereits vitale und funktionelle vaskularisierte Gewebekonstrukte hergestellt werden. Die mechanische Kompression könnte dabei im Körper ausreichen, um beispielsweise die MZ zur ausbleibenden Kollagen Typ I Synthese anzuregen.

Für die Implantatentwicklung muss der Herstellungsprozess des Gewebekonstrukts aus dem

Forschungs- und Entwicklungslabor auf GMP-konforme Herstellung übertragen werden. Bei der Verwendung eines Bioreaktors im Kulturprozess handelt es sich um ein kontrollierbares System, welches benutzerdefiniert einstellbar ist. Jedoch ist auch die Validierung jedes einzelnen Schritts des gesamten Kultursystems zu berücksichtigen, die aufwendig und zeitintensiv ist, vor allem wenn die Kultivierung eines Gewebekonstrukts in einem komplexen Bioreaktor stattfindet. Zudem muss der Prozess effizient gestaltet sein, um ein erfolgreiches Produkt herstellen zu können. Die Kultivierung im Bioreaktor, das Autoklavieren der Bauteile, die Ansteuerung der Pumpen und des Druckzylinders ist kosten- und zeitintensiv und zudem ist eine erhöhte Kontaminationsgefahr bei der Verwendung des Systems gegeben.

Eine andere Anwendung neben der Verwendung als dynamisches Kulturgefäß für das neu entwickelte Bioreaktorsystem, das sowohl Scher- als auch Kompressionskräfte simuliert, könnte die Verwendung als Prüftestsystem von Implantaten sein. Möglich ist dabei die Durchführung von Dauertests zur Optimierung und zur Qualitätsprüfung der Gewebekonstrukte. Spezielle Prüfsysteme wurden bereits für die Testung künstlich hergestellter Herzklappen oder Herzklappentransplantate entwickelt. Die verwendeten Ersatzmaterialien sollen dabei auf Haltbarkeit und Langzeitfunktion untersucht werden. Beispielsweise der M6™ Heart Valve Tester von Dynatek Labs (Missouri, MO USA) ist eine solche Prüftestmaschine, die sechs Proben gleichzeitig testen kann. Zur Qualifizierung der Auslegung und Herstellung eines minimal-invasiven Herzklappenersatzes gibt es ein Norm-Entwurf, DIN EN ISO 5840-3 in diesem Prüfungen zur Beurteilung der physikalischen, chemischen, biologischen und mechanischen Eigenschaften solcher Herzklappenersatzgewebe festgelegt sind.

6.6 Implantate

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Entwicklung eines funktionellen 3D Meniskuskonstrukts, das als Implantat verwendet werden soll. Verglichen mit bereits bestehenden Meniskusimplantaten ist das entwickelte Konstrukt funktionell und auf Basis natürlicher Biomaterialien aufgebaut. Mit Hilfe der vaskularisierten BioVaSc®-Matrix ist das 3D Kollagen-Konstrukt bis ins Innere versorgt und kann bei der Implantation über den erhaltenen arteriellen und venösen Anschluss an den körpereigenen Blutkreislauf angeschlossen werden. Dies konnte bereits erfolgreich bei einer Tracheaimplantation am Menschen gezeigt werden (Mertsching et al., 2009). Damit hat das hier entwickelte Meniskuskonstrukt die Limitationen von bereits bestehenden Implantaten, der fehlenden Vaskularisierung und mangelnder Integration des Actifit® oder CMI Menaflex®, abgelöst.

Für die Implantatherstellung und die damit verbundene Überführung des Konstrukts in GMP-konforme Herstellprozesse müssen einige Punkte berücksichtigt werden. Das Meniskuskonstrukt ist aufgrund der Zellen und biologischen Biomaterialien, wie das Kollagen Hydrogel aus mehreren Bestandteilen aufgebaut. Die Zulassung für das Ersatzgewebe als Implantat ist demnach umfangreich. Heute gibt es bereits eigens für das GMP hergestellte Zellkulturmedien, die für die Implantatherstellung verwendet werden dürfen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Zellkulturarbeiten mit Medien, die mit 2% FCS einen geringen FCS Gehalt beinhalten. Lediglich das Medium, das für die MZ benutzt und mit 10% FCS supplementiert wurde, muss ausgetauscht werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der berücksichtigt werden muss ist eine einfache Herstellung des Implantats. Daher, wie im vorangegangenen Kapitel bereits diskutiert, ist es unabdingbar, die Notwendigkeit des komplexen Bioreaktorsystems, der Druckkraft und Scherspannung auf das Konstrukt abgibt, zu prüfen. Dafür können Ergebnisse aus Tierversuchen im Großtier, wie beispielsweise Schwein oder Pferd herangezogen werden. Als Vorbereitung für solche Tierversuche, erfolgte neben dem Aufbau des Meniskuskonstrukts mit humanen Zellen der Aufbau mit porcinen Zellen. Es wurde geprüft, ob sich die primären Zellen der beiden Spezies in der *in vitro* Kultur ähnlich verhalten und unter gleichen Bedingungen wachsen. Für beide Spezies konnten funktionelle Gewebekonstrukte aufgebaut werden. Ein Tierversuchsantrag, die Konstrukte als Komplett-Meniskusersatz im Schwein zu testen wurde bereits gestellt und auch genehmigt. Neben dem Einsatz eines Meniskusimplantats im Menschen, ist der Einsatz eines Meniskusersatzgewebes in Sportpferden ein großer Markt. Rennpferde beispielsweise sind sehr teuer und Meniskusverletzungen kommen häufig vor. Aus diesem Grund sind Versuche geplant, das entwickelte Meniskuskonstrukt auf ein equines Modell *in vitro* zu übertragen als Vorbereitung für Großtierversuche und Therapien im Pferd.

6.7 Ausblick

Es konnte erfolgreich ein komplexes und funktionelles Meniskusgewebekonstrukt mittels Methode des Tissue Engineering generiert werden. Für die Zulassung des Meniskuskonstrukts als biologisches, zellbasiertes Implantat müssen Tierversuche durchgeführt werden. Vorversuche für Großtierversuche im Schwein und Pferd wurden bereits unternommen bzw. sind in Bearbeitung. Die Tierversuche sollen das entwickelte Gewebekonstrukt auf Stabilität und Funktionalität prüfen.

Als Vorbereitung für eine GMP-konforme Herstellung des Gewebekonstrukts müssen Kultur-

medien und Zusätze geprüft, zugelassen und gegebenenfalls verändert werden. Ebenfalls die Protokolle, die für den Forschungs- und Entwicklungsbereich standardisiert und neu entwickelt worden sind, müssen angepasst werden.

Durch die Kombination von mehreren Zelltypen entstand eine Optimierung und eine weitere Komplexität des Systems. Es konnte festgestellt werden, dass für die Generierung von lebensgroßen Gewebemodellen die Vaskularisierung eine unabdingbare Rolle spielt und für die ausreichende Versorgung der Zellen wichtig ist. Mit Hilfe der vaskularisierten Matrix können in Zukunft auch andere Ersatzgewebe in klinisch relevanter Dimension erzeugt werden.

Weiter wurde eine geeignete 3D Trägerstruktur entwickelt, die elektrogessponnene Kol I/II Matrix, die eine Mikroumgebung mit gezielter Faserausrichtung und unterschiedlichen Kollagenbestandteilen für Zellen darstellt. Stammzellen zeigten eine spontan chondrogene Differenzierung auf der Matrix nach drei Wochen Kultivierung, ohne dass im Kulturmedium zusätzliche Wachstumsfaktoren supplementiert wurden. *In vitro* Langzeitversuche, die eine Kulturdauer von drei Wochen übersteigen, können Aussagen über die Dauerfestigkeit und eine mögliche Veränderung des Differenzierungsstatus der Zellen geben. Für den Einsatz als Implantat muss die Matrix auf ihre biomechanische Festigkeit getestet werden, um ihre Stabilität unter Druck- und Zugbelastungen zu evaluieren. Weiter müssen *in vivo* Versuche zur Feststellung der Resorptionszeit und der Verträglichkeit durchgeführt werden.

Der Trend, strukturierte Matrices im Tissue Engineering zu verwenden steigt weiter an, vor allem im Bereich der Knorpelregeneration. In diesen Arbeiten wird versucht, die natürliche Schichtung und Strukturierung eines Knorpelgewebes nachzuahmen. Auch für das Meniskus Tissue Engineering wurde gemeinsam mit dem Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ) der Universität Würzburg im vergangenen Jahr ein neuartiges Biomaterial entwickelt, welches aus unterschiedlichen Kollagentypen besteht und mit intrinsischen Kanälen mit Hilfe von Eiskristallen strukturiert wird. Vorteil der kryostrukturierten Scaffolds im Vergleich zu den eigens hergestellten Kol I/II ES-Matrices ist die Höhe von ca. 10 mm und ihre Druckstabilität. Zu beobachten sind eine gute Zelleinwanderung in die Matrix und eine spontane chondrogene Differenzierung von hMSZ. Weitere Experimente müssen mit diesem Biomaterial durchgeführt werden, um dessen Eignung als Meniskusersatzgewebe zu prüfen.

Ein Prototyp des neu entwickelten und konstruierten Bioreaktors, mit dem Gewebekonstrukte unter Kompression und Scherspannung kultiviert werden können, ist aufgebaut. Seine Funktion muss in zukünftigen *in vitro* Versuchen geprüft werden. Der Bioreaktor kann entweder als dynamisches Kultursystem für Knorpel- oder Meniskuskonstrukte verwendet werden, oder als Prüftestsystem von Implantaten dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kenntnisse im Zusammenspiel der Zellbiologie, der Biomaterialentwicklung und der Bioreaktortechnologie gewonnen, die im Bereich Tissue Engineering angewendet werden können und in Zukunft eine klinische Relevanz haben.

Literaturverzeichnis

- Achtnich, A., Forkel, P., Metzloff, S., and Petersen, W. (2011). Indikation und technik der meniskusrefixation. *Arthroskopie*, 24:22–29.
- Adair, T. H. and Montani, J.-P. (2010). *Angiogenesis*. Morgan und Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Ahrendt, G., Chickering, D., and Ranieri, J. (1998). Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering. *Tissue Engineering*, 2:117–130.
- Akiyama, H. (2008). Control of chondrogenesis by the transcription factor sox9. *Mod Rheumatol*, 18(3):213–9.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., and al., e. (2003). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag.
- Amado, L. C., Saliaris, A. P., Schuleri, K. H., St John, M., Xie, J. S., Cattaneo, S., Durand, D. J., Fitton, T., Kuang, J. Q., Stewart, G., Lehrke, S., Baumgartner, W. W., Martin, B. J., Heldman, A. W., and Hare, J. M. (2005). Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32):11474–9.
- Anegg, U., Bexten, T., Bourry, F. M., Celesnik, J., Dietz, A., Fischer, S., Klobusicky, P., Lingohr, P., Oechsner, M., and Schöche, J. (2011). *Gewebereparatur ohne Kompromisse - Permacol biologisches Implantat*, volume Caduceus News Spezialausgabe STR. Covidien Deutschland GmbH, Regensburg.
- Angele, P., Johnstone, B., Kujat, R., Zellner, J., Nerlich, M., Goldberg, V., and Yoo, J. (2008). Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A*, 85(2):445–55.
- Artmann, G., Minger, S., and Hescheler, J. (2011). *Stem Cell Engineering*. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Ashwin, H., Bryan, N., Wohler, S., and Hunt, J. (2012). In vivo and in vitro assessment of foreign body reaction to hmdi crosslinked porcine dermis. *European Cells and Materials*, 23(4):65.
- Aufderheide, A. C. and Athanasiou, K. A. (2005). Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*, 11(7-8):1095–104.
- Aufderheide, A. C. and Athanasiou, K. A. (2006). A direct compression stimulator for articular cartilage and meniscal explants. *Ann Biomed Eng*, 34(9):1463–74.
- Augustin, H. (2004). *Methods in Endothelial Cell Biology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, K., and Mense, S. (2007). *Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25):3587–93.
- Baker, B. M., Gee, A. O., Sheth, N. P., Huffman, G. R., Sennett, B. J., Schaer, T. P., and Mauck, R. L. (2009a). Meniscus tissue engineering on the nanoscale: from basic principles to clinical application. *J Knee Surg*, 22(1):45–59.
- Baker, B. M., Nathan, A. S., Huffman, G. R., and Mauck, R. L. (2009b). Tissue engineering with meniscus cells derived from surgical debris. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(3):336–45.
- Balaji, S., King, A., Crombleholme, T. M., and Keswani, S. G. (2013). The role of endothelial progenitor cells in postnatal vasculogenesis: Implications for therapeutic neovascularization and wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(6):283–295.
- Barbero, A., Ploegert, S., Heberer, M., and Martin, I. (2003). Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 48(5):1315–25.
- Benninghoff, A. und Drenckhahn, D. (2003). *Anatomie*. Urban und Fischer Verlag, 16. auflage edition.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*, 28(3):325–47.
- Bhosale, A. M. and Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 87:77–95.
- Brittberg, M. (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res*, 367 Suppl:S147–55.

- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331(14):889–95.
- Brittberg, M., Nilsson, A., Lindahl, A., Ohlsson, C., and Peterson, L. (1996). Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res*, 326:270–83.
- Brittberg, M., Peterson, L., Sjogren-Jansson, E., Tallheden, T., and Lindahl, A. (2003). Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. a review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3:109–15.
- Bundesministerium (2006). *Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Gesundheit in Deutschland*. Berlin.
- Bundesverband, B. (2011). *BKK-Gesundheitsreport 2011 Zukunft der Arbeit*. Essen.
- Caplan, A. I. and Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98(5):1076–84.
- Caplan, A. I. and Goldberg, V. M. (1999). Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*, 367 Suppl:S12–6.
- Cavallo, J. A., Greco, S. C., Liu, J., Frisella, M. M., Deeken, C. R., and Matthews, B. D. (2013). Remodeling characteristics and biomechanical properties of a crosslinked versus a non-crosslinked porcine dermis scaffolds in a porcine model of ventral hernia repair. *Hernia*.
- Cebotari, S., Walles, T., Sorrentino, S., Haverich, A., and Mertsching, H. (2002). Guided tissue regeneration of vascular grafts in the peritoneal cavity. *Circ Res*, 90(8):e71.
- Chen, H. C. and Hu, Y. C. (2006). Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol Lett*, 28(18):1415–23.
- Chen, Y. J., Wang, C. J., Yang, K. D., Chang, P. R., Huang, H. C., Huang, Y. T., Sun, Y. C., and Wang, F. S. (2003). Pertussis toxin-sensitive galphai protein and erk-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett*, 554(1-2):154–8.
- Chowdhury, T. T., Bader, D. L., Shelton, J. C., and Lee, D. A. (2003). Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression. *Arch Biochem Biophys*, 417(1):105–11.

- Cisa, J., Basora, J., Madarnas, P., Ghibely, A., and Navarro-Quilis, A. (1995). Meniscal repair by synovial flap transfer. healing of the avascular zone in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 66(1):38–40.
- Cooper, D. E., Arnoczky, S. P., and Warren, R. F. (1990). Arthroscopic meniscal repair. *Clin Sports Med*, 9(3):589–607.
- Cornwell, K. G., Landsman, A., and James, K. S. (2009). Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg*, 26(4):507–23.
- Csaki, C., Schneider, P. R., and Shakibaei, M. (2008). Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Ann Anat*, 190(5):395–412.
- DAK-Forschung (2012). *DAK-Gesundheitsreport 2012*. IGES Institut GmbH, Berlin.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L., and Yang, Y. (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 8(5):739–50.
- de Groot, J. H., de Vrijer, R., Pennings, A. J., Klompmaker, J., Veth, R. P., and Jansen, H. W. (1996). Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. *Biomaterials*, 17(2):163–73.
- de Groot, J. H., Zijlstra, F. M., Kuipers, H. W., Pennings, A. J., Klompmaker, J., Veth, R. P., and Jansen, H. W. (1997). Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly(l-lactide/epsilon-caprolactone) implants. *Biomaterials*, 18(8):613–22.
- Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Bellemans, J., Neys, J., De Bari, C., and Luyten, F. P. (2003). Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res*, 21(1):123–31.
- Duyndam, M., Verloop, R., Engelse, M., , and van Hinsbergh, V. (2006). Improving tissue graft survival by vascularization support. *Dutch Symposium on Tissue Engineering, Noordwijkerhout, The Netherlands*, Abstract no. 54.
- Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., Wang, L., Ballock, R. T., and Lefebvre, V. (2012). Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell*, 22(3):597–609.
- Einhorn, T., O'Keefe, R., and Buckwalter, J. (2007). Orthopaedic basic science foundations of clinical practice 3rd ed. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*.

- Eiselt, P., Kim, B. S., Chacko, B., Isenberg, B., Peters, M. C., Greene, K. G., Roland, W. D., Loebbeck, A. B., Burg, K. J., Culberson, C., Halberstadt, C. R., Holder, W. D., and Mooney, D. J. (1998). Development of technologies aiding large-tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 14(1):134–40.
- Elder, S. H., Goldstein, S. A., Kimura, J. H., Soslowsky, L. J., and Spengler, D. M. (2001). Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading. *Ann Biomed Eng*, 29(6):476–82.
- Elder, S. H., Kimura, J. H., Soslowsky, L. J., Lavagnino, M., and Goldstein, S. A. (2000). Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J Orthop Res*, 18(1):78–86.
- Folkman, J. and Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, 138(4):745–53.
- Forschungsgemeinschaft, D. (2004). *Tierversuche in der Forschung*. Lemmens Verlags- und Mediengesellschaft mbH, Bonn.
- Frank, E. H., Jin, M., Loening, A. M., Levenston, M. E., and Grodzinsky, A. J. (2000). A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech*, 33(11):1523–7.
- Glatz, F., Neumeister, M., Suchy, H., Lyons, S., Damikas, D., and Mowlavi, A. (2003). A tissue-engineering technique for vascularized laryngotracheal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129(2):201–6.
- Goble, E. M., Kohn, D., Verdonk, R., and Kane, S. M. (1999). Meniscal substitutes—human experience. *Scand J Med Sci Sports*, 9(3):146–57.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 97(1):33–44.
- Goldstein, A. S., Juarez, T. M., Helmke, C. D., Gustin, M. C., and Mikos, A. G. (2001). Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22(11):1279–88.
- Gorgieva, S., Strancar, J., and Kokol, V. (2014). Evaluation of surface/interface-related physicochemical and microstructural properties of gelatin 3d scaffolds, and their influence on fibroblast growth and morphology. *J Biomed Mater Res A*.

- Grafahrend, D., Heffels, K. H., Beer, M. V., Gasteier, P., Moller, M., Boehm, G., Dalton, P. D., and Groll, J. (2011). Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nat Mater*, 10(1):67–73.
- Graff, R. D., Lazarowski, E. R., Banes, A. J., and Lee, G. M. (2000). Atp release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum*, 43(7):1571–9.
- Greaves, P., Williams, A., and Eve, M. (2004). First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov*, 3(3):226–36.
- Greiner, A. and Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(30):5670–703.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., and Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5):352–66.
- Gunja, N. J., Uthamanthil, R. K., and Athanasiou, K. A. (2009). Effects of tgf-beta1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. *Biomaterials*, 30(4):565–73.
- Hansmann, J. (2005). *Entwicklung eines Bioreaktors für den Einsatz im vaskularisierten Tissue Engineering*. PhD thesis, Universität Stuttgart.
- Hansmann, J. (2010). *Induktion von Angiogenese in vitro durch modellbasierte Bioreaktor-technologie*, volume D93 of *Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 035*. Fraunhofer Verlag, Stuttgart.
- Hattori, T., Müller, C., Gebhard, S., Bauer, E., Pausch, F., Schlund, B., Bösl, M., Hess, A., Surmann-Schmitt, C., von der Mark, H., de Crombrughe, B., and von der Mark, K. (2009). Sox9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, 137:901–911.
- Herwig, J.; Egner, E. and Buddecke, E. (1984). Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43(635).
- Heymer, A. (2008). *Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Cartilage Reconstruction*. PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Hoberg, M., Schmidt, E. L., Tuerk, M., Stark, V., Aicher, W. K., and Rudert, M. (2009). Induction of endostatin expression in meniscal fibrochondrocytes by co-culture with endothelial cells. *Arch Orthop Trauma Surg*, 129(8):1137–43.

- Hofmann, A., Ritz, U., Verrier, S., Eglin, D., Alini, M., Fuchs, S., Kirkpatrick, C. J., and Rommens, P. M. (2008). The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3d co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*, 29(31):4217–26.
- Huang, C. Y., Hagar, K. L., Frost, L. E., Sun, Y., and Cheung, H. S. (2004). Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22(3):313–23.
- Hung, C. T., Mauck, R. L., Wang, C. C., Lima, E. G., and Ateshian, G. A. (2004). A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Ann Biomed Eng*, 32(1):35–49.
- Hunter, C. J., Imler, S. M., Malaviya, P., Nerem, R. M., and Levenston, M. E. (2002). Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen i gels. *Biomaterials*, 23(4):1249–59.
- Hunter, C. J., Mouw, J. K., and Levenston, M. E. (2004). Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(2):117–30.
- Hunter, J. (2007). A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds. 1794. *Clin Orthop Relat Res*, May(458):27–34.
- Hunziker, E. B. (2001). Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(1):22–32.
- Ibarra, C., Jannetta, C., Vacanti, C. A., Cao, Y., Kim, T. H., Upton, J., and Vacanti, J. P. (1997). Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation. *Transplant Proc*, 29(1-2):986–8.
- Ibarra, C., Koski, J. A., and Warren, R. F. (2000). Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am*, 31(3):411–8.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 9(6):685–93.
- Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., and Pittenger, M. F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 275(13):9645–52.

- Jenniskens, Y. M., Koevoet, W., de Bart, A. C., Weinans, H., Jahr, H., Verhaar, J. A., DeGroot, J., and van Osch, G. J. (2006). Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by igf1, tgfbeta2 and fgf2. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(11):1136–46.
- Jerosch, J. and Prymka, M. (1997). Propriozeptive defizite des kniegelenks nach ruptur des medialen meniskus. *Unfallchirurg*, 100:444–448.
- Johnson, L. L. and Feagin, J. A., J. (2000). Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy*, 16(2):191–6.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., and Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238(1):265–72.
- Kahlig, A., Hansmann, J., Groeber, F., Schwarz, T., Weyhmüller, J., Illig, A., Kleinhans, C., and Walles, H. (2013). In silico approaches for the identification of optimal culture condition for tissue engineered bone substitutes. *Current Analytical Chemistry*, 9(1):1–13.
- Kai, D., Jin, G., Prabhakaran, M. P., and Ramakrishna, S. (2013). Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. *Biotechnol J*, 8(1):59–72.
- Kamekura, S., Kawasaki, Y., Hoshi, K., Shimoaka, T., Chikuda, H., Maruyama, Z., Komori, T., Sato, S., Takeda, S., Karsenty, G., Nakamura, K., Chung, U. I., and Kawaguchi, H. (2006). Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*, 54(8):2462–70.
- Kanczler, J. M. and Oreffo, R. O. (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15:100–14.
- Kang, S. W., Son, S. M., Lee, J. S., Lee, E. S., Lee, K. Y., Park, S. G., Park, J. H., and Kim, B. S. (2006). Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. *J Biomed Mater Res A*, 77(4):659–71.
- Kelly, B. D., Hackett, S. F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P. A., and Semenza, G. L. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*, 93(11):1074–81.
- Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S., Iris Hermanns, M., Peters, K., and Unger, R. E. (2007). Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Bio-materials*, 28(34):5193–8.

- Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S., and Unger, R. E. (2011). Co-culture systems for vascularization—learning from nature. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5):291–9.
- Kirkpatrick, C. J., Krump-Konvalinkova, V., Unger, R. E., Bittinger, F., Otto, M., and Peters, K. (2002). Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol Eng*, 19(2-6):211–7.
- Klepetko, W., Marta, G. M., Wisser, W., Melis, E., Kocher, A., Seebacher, G., Aigner, C., and Mazhar, S. (2004). Heterotopic tracheal transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127(3):862–7.
- Klomp maker, J., Jansen, H. W., Veth, R. P., Nielsen, H. K., de Groot, J. H., and Pennings, A. J. (1993). Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. *Clin Mater*, 14(1):1–11.
- Klomp maker, J., Jansen, H. W., Veth, R. P., Nielsen, H. K., de Groot, J. H., Pennings, A. J., and Kuijer, R. (1992). Meniscal repair by fibrocartilage? an experimental study in the dog. *J Orthop Res*, 10(3):359–70.
- Klomp maker, J., Veth, R. P., Jansen, H. W., Nielsen, H. K., de Groot, J. H., and Pennings, A. J. (1996a). Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. *Biomaterials*, 17(12):1169–75.
- Klomp maker, J., Veth, R. P., Jansen, H. W., Nielsen, H. K., de Groot, J. H., Pennings, A. J., and Kuijer, R. (1996b). Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity. *Biomaterials*, 17(17):1685–91.
- Kock, L. M., Malda, J., Dhert, W. J., Ito, K., and Gawlitta, D. (2013). Flow-perfusion interferes with chondrogenic and hypertrophic matrix production by mesenchymal stem cells. *J Biomech*.
- Koehlin, N., Pisam, M., Poujeol, P., Tauc, M., and Rambourg, A. (1991). Conversion of a rabbit proximal convoluted tubule (pct) into a cell monolayer: ultrastructural study of cell dedifferentiation and redifferentiation. *Eur J Cell Biol*, 54(2):224–36.
- Kohn, D., Wirth, C. J., Reiss, G., Plitz, W., Maschek, H., Erhardt, W., and Wulker, N. (1992). Medial meniscus replacement by a tendon autograft. experiments in sheep. *J Bone Joint Surg Br*, 74(6):910–7.
- Kohn, L., Lorenz, S., and Hinterwimmer, S. (2011). Meniskusimplantate. *Arthroskopie*, 24:42–47.

- Krause, W. R., Pope, M. H., Johnson, R. J., and Wilder, D. G. (1976). Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 58(5):599–604.
- Kreuz, P., Lenz, R., Vogt, S., Imhoff, A., and Tischer, T. (2011). Meniskus tissue engineering. *Arthroskopie*, 24:57–61.
- Lanza, R. (2009). *Essentials of Stem Cell Biology, Second Edition*. Academic Press.
- Lee, D. A. and Bader, D. L. (1997). Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *J Orthop Res*, 15(2):181–8.
- Lee, S. J., Aadalen, K. J., Malaviya, P., Lorenz, E. P., Hayden, J. K., Farr, J., Kang, R. W., and Cole, B. J. (2006). Tibiofemoral contact mechanics after serial medial meniscectomies in the human cadaveric knee. *Am J Sports Med*, 34(8):1334–44.
- Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., and Lelkes, P. I. (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30):5999–6008.
- Lindahl, A., Brittberg, M., and Peterson, L. (2003). Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp*, 249:175–86; discussion 186–9, 234–8, 239–41.
- Lisignoli, G., Zini, N., Remiddi, G., Piacentini, A., Puggioli, A., Trimarchi, C., Fini, M., Maraldi, N. M., and Facchini, A. (2001). Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold. *Biomaterials*, 22(15):2095–105.
- Liu, W., Thomopoulos, S., and Xia, Y. (2012a). Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv Healthc Mater*, 1(1):10–25.
- Liu, Y., Chan, J. K., and Teoh, S. H. (2012b). Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Lohmann, S. (2005). *Eigenschaften biologischer Materialien zur Simulation menschlicher Bewegung. Funktionell-anatomische Grundlagen und Materialeigenschaften zur Erstellung dreidimensionaler Körpermodelle im Computer*. PhD thesis, Universität Konstanz.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie*. Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Lusse, S., Knauss, R., Werner, A., Grunder, W., and Arnold, K. (1995). Action of compression and cations on the proton and deuterium relaxation in cartilage. *Magn Reson Med*, 33(4):483–9.

- Macchiarini, P., Walles, T., Biancosino, C., and Mertsching, H. (2004). First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128(4):638–41.
- Maher, S. A., Rodeo, S. A., Doty, S. B., Brophy, R., Potter, H., Foo, L. F., Rosenblatt, L., Deng, X. H., Turner, A. S., Wright, T. M., and Warren, R. F. (2010). Evaluation of a porous polyurethane scaffold in a partial meniscal defect ovine model. *Arthroscopy*, 26(11):1510–9.
- Maier, D., Braeun, K., Steinhauser, E., Ueblacker, P., Oberst, M., Kreuz, P. C., Roos, N., Martinek, V., and Imhoff, A. B. (2007). In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement. *J Orthop Res*, 25(12):1598–608.
- Marlovits, S., Hombauer, M., Truppe, M., Vecsei, V., and Schlegel, W. (2004). Changes in the ratio of type-i and type-ii collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 86(2):286–95.
- Martinek, V. and Imhoff, A. (2008). Das künstliche meniskusimplantat. *Arthroskopie*, 21:266–270.
- Mauck, R. L., Seyhan, S. L., Ateshian, G. A., and Hung, C. T. (2002). Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng*, 30(8):1046–56.
- Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H., Valhmu, W. B., Hung, C. T., and Ateshian, G. A. (2000). Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng*, 122(3):252–60.
- McAndrews, P. T. and Arnoczky, S. P. (1996). Meniscal repair enhancement techniques. *Clin Sports Med*, 15(3):499–510.
- McKenna, K. A., Gregory, K. W., Sarao, R. C., Maslen, C. L., Glanville, R. W., and Hinds, M. T. (2012). Structural and cellular characterization of electrospun recombinant human tropoelastin biomaterials. *J Biomater Appl*, 27(2):219–30.
- Mertsching, H., Schanz, J., Steger, V., Schandar, M., Schenk, M., Hansmann, J., Dally, I., Friedel, G., and Walles, T. (2009). Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation*, 88(2):203–10.
- Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J., and Knapp, W. H. (2005). Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*, 26(33):6610–7.

- Messner, K. (1994a). The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using dacron and teflon implants. *Biomaterials*, 15(4):243–50.
- Messner, K. (1994b). The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using dacron and teflon implants. *Biomaterials*, 15(4):243–50.
- Messner, K. (1994c). Meniscal substitution with a teflon-periosteal composite graft: a rabbit experiment. *Biomaterials*, 15(3):223–30.
- Minuth, W., Strehl, R., and Schumacher, K. (2005). *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*. Wiley-Vch Verlag GmbH, Weinheim.
- Morrison, J. B. (1970). The mechanics of the knee joint in relation to normal walking. *J Biomech*, 3(1):51–61.
- Müller, S. M., Shortkroff, S., Schneider, T. O., Breinan, H. A., Yannas, I. V., and Spector, M. (1999). Meniscus cells seeded in type i and type ii collagen-gag matrices in vitro. *Biomaterials*, 20(8):701–9.
- Nakatsu, M. N., Sainson, R. C., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Perez-del Pulgar, S., Carpenter, P. M., and Hughes, C. C. (2003). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (huvec) in fibrin gels: the role of fibroblasts and angiopoietin-1. *Microvasc Res*, 66(2):102–12.
- Natsu-Ume, T., Majima, T., Reno, C., Shrive, N. G., Frank, C. B., and Hart, D. A. (2005). Menisci of the rabbit knee require mechanical loading to maintain homeostasis: cyclic hydrostatic compression in vitro prevents derepression of catabolic genes. *J Orthop Sci*, 10(4):396–405.
- Neves, A. A., Medcalf, N., and Brindle, K. M. (2002). Tissue engineering of meniscal cartilage using perfusion culture. *Ann N Y Acad Sci*, 961:352–5.
- Nguyen, L., Kudva, A., Saxena, N., and Roy, K. (2011). Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel. *Biomaterials*, 32(29):6946–6952.
- Nomi, M., Atala, A., Coppi, P. D., and Soker, S. (2002). Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med*, 23(6):463–83.

- Nöth, U., Rackwitz, L., Heymer, A., Weber, M., Baumann, B., Steinert, A., Schutze, N., Jakob, F., and Eulert, J. (2007). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A*, 83(3):626–35.
- Noth, U., Tuli, R., Osyczka, A. M., Danielson, K. G., and Tuan, R. S. (2002). In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 8(1):131–44.
- Novosel, E. C., Kleinhans, C., and Kluger, P. J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5):300–11.
- Orthoworld (2009-2010). *The Orthopaedic Industry annual report*.
- Pabbruwe, M. B., Kafienah, W., Tarlton, J. F., Mistry, S., Fox, D. J., and Hollander, A. P. (2010). Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*, 31(9):2583–91.
- Pallua, N. and Suschek, C. (2011). *Tissue Engineering*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Pangborn, C. A. and Athanasiou, K. A. (2005a). Effects of growth factors on meniscal fibrochondrocytes. *Tissue Eng*, 11(7-8):1141–8.
- Pangborn, C. A. and Athanasiou, K. A. (2005b). Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res*, 23(5):1184–90.
- Park, J. S., Shim, M. S., Shim, S. H., Yang, H. N., Jeon, S. Y., Woo, D. G., Lee, D. R., Yoon, T. K., and Park, K. H. (2011). Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing tgfbeta3. *Biomaterials*, 32(32):8139–49.
- Pasa, L.; Visna, P. (2005). Suture of meniscus. *Scripta Medica (BRNO)*, 78(3):135–150.
- Peretti, G., Caruso, E., Randolph, M., and Zaleske, D. (2001). Meniscal repair using engineered tissue. *J Orthop Res*, 19(2):278–285.
- Petersen, W. and Tillmann, B. (1995). Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. a cadaver study. *Acta Orthop Scand*, 66(4):308–12.
- Petersen, W. and Tillmann, B. (1998). Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)*, 197(4):317–24.
- Pharmazeutische Zeitung, o. (2012). *Gewebeersatz: Knorpel aus dem Reagenzglas*, volume 12. Govi Verlag.

- Pittenger, M. F. (2008). Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*, 449:27–44.
- Poole, C. A. (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 191 (Pt 1):1–13.
- Port, J., Jackson, D. W., Lee, T. Q., and Simon, T. M. (1996). Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med*, 24(4):547–55.
- Pufe, T., Kurz, B., Petersen, W., Varoga, D., Mentlein, R., Kulow, S., Lemke, A., and Tillmann, B. (2005). The influence of biomechanical parameters on the expression of vegf and endostatin in the bone and joint system. *Ann Anat*, 187(5-6):461–72.
- Pusch, J., Votteler, M., Göhler, S., Engl, J., Hampel, M., Walles, H., and Schenke-Layland, K. (2011). The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine. *Biomaterials*, 32(30):7469–7478.
- Quintana, L., zur Nieden, N. I., and Semino, C. E. (2009). Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 15(1):29–41.
- Rauh, J., Milan, F., Gunther, K. P., and Stiehler, M. (2011). Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 17(4):263–80.
- Reboredo, J., Moll, C., Schwarz, T., Appelt, A., Schurlein, S., Walles, H., and Nietzer, S. (2013). Tissue engineering of a human 3d in vitro tumor test system. *J Vis Exp*, 78.
- Ribatti, D., Vacca, A., and Presta, M. (2000). The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*, 35(5):227–31.
- Rodkey, W. G., Steadman, J. R., and Li, S. T. (1999). A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop Relat Res*, Oct(367 Suppl):S281–92.
- Rouwkema, J., de Boer, J., and Van Blitterswijk, C. A. (2006). Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng*, 12(9):2685–93.
- Rücker, C. (2011). *Interaktionen von humanen mesenchymalen Vorläuferzellen mit Meniskuszellen und mikrovaskulären Endothelzellen in einem 2D-Kokultursystem*. PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät Biologie.

- Sah, R. L., Kim, Y. J., Doong, J. Y., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H., and Sandy, J. D. (1989). Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J Orthop Res*, 7(5):619–36.
- Sandmann, G. H., Eichhorn, S., Vogt, S., Adamczyk, C., Aryee, S., Hoberg, M., Milz, S., Imhoff, A. B., and Tischer, T. (2009). Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 91(2):567–74.
- Santos, M. I., Tuzlakoglu, K., Fuchs, S., Gomes, M. E., Peters, K., Unger, R. E., Piskin, E., Reis, R. L., and Kirkpatrick, C. J. (2008). Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29(32):4306–13.
- Santos, M. I., Unger, R. E., Sousa, R. A., Reis, R. L., and Kirkpatrick, C. J. (2009). Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials*, 30(26):4407–15.
- Schanz, J., Pusch, J., Hansmann, J., and Walles, H. (2010). Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol*, 148(1):56–63.
- Scheffler, S. (2011). Allogene meniskustransplantation. *Arthroskopie*, 24:36–41.
- Schiebler, T.H. und Korf, H.-W. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Springer Verlag, 10. auflage edition.
- Schiller, J. (2004). Nmr-spektroskopie an biologischen, biomedizinischen und modellsystemen. Technical report, Institut für Medizinische Physik und Biophysik.
- Schinagl, R. M., Gurskis, D., Chen, A. C., and Sah, R. L. (1997). Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *J Orthop Res*, 15(4):499–506.
- Schmid, J., Wallkamm, B., Hammerle, C. H., Gogolewski, S., and Lang, N. P. (1997). The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. a case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res*, 8(3):244–8.
- Schrobbach, K., Klein, T. J., Crawford, R., Upton, Z., Malda, J., and Leavesley, D. I. (2012). Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 347(3):649–63.
- Schulz, R. M. and Bader, A. (2007). Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*, 36(4-5):539–68.

- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H. J., Scheid, A., and Shakibaei, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308(3):371–9.
- Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., de Souza, P., John, T., and Shakibaei, M. (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient shc-erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(6):448–58.
- Schürlein, S. (2011). *Entwicklung Kollagen II-basierter Nanofaserkonstrukte zur Gelenkknorpelregeneration: Biomimetische Zellträger für die matrixgekoppelte autologe Zelltransplantation*. PhD thesis, Albstadt- Sigmaringen Universität.
- Schwab, A. (2013). *Einfluss von strukturierten Biomaterialien auf die Differenzierung von Stammzellen in Ko-Kultur mit Endothelzellen*. PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Shakibaei, M., De Souza, P., and Merker, H. J. (1997). Integrin expression and collagen type ii implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int*, 21(2):115–25.
- Shakibaei, M. and Merker, H. J. (1999). Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res*, 296(3):565–73.
- Shakibaei, M., Schroter-Kermani, C., and Merker, H. J. (1993). Matrix changes during long-term cultivation of cartilage (organoid or high-density cultures). *Histol Histopathol*, 8(3):463–70.
- Shakibaei, M., Seifarth, C., John, T., Rahmanzadeh, M., and Mobasheri, A. (2006). Igf- i extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between sox9 and erk1/2. *Biochem Pharmacol*, 72(11):1382–95.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398):843–5.
- Simmons, C. A., Matlis, S., Thornton, A. J., Chen, S., Wang, C. Y., and Mooney, D. J. (2003). Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (erk1/2) signaling pathway. *J Biomech*, 36(8):1087–96.
- Sohier, J., Moroni, L., van Blitterswijk, C., de Groot, K., and Bezemer, J. (2008). Critical factors in the design of growth factor releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. *Expert Opinion Drug Delivery*, 5(5):543–566.

- Spank, H. (2004). *Klinische Ergebnisse und Erfahrungen nach arthroskopischer Meniskusrefixation bei traumatischen Meniskusläsionen*. PhD thesis, Ernst-Moritz-Arndt-Universität.
- Stabile, K. J., Odom, D., Smith, T. L., Northam, C., Whitlock, P. W., Smith, B. P., Van Dyke, M. E., and Ferguson, C. M. (2010). An acellular, allograft-derived meniscus scaffold in an ovine model. *Arthroscopy*, 26(7):936–48.
- Stapleton, T. W., Ingram, J., Fisher, J., and Ingham, E. (2011). Investigation of the regenerative capacity of an acellular porcine medial meniscus for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A*, 17(1-2):231–42.
- Stevens, M. M. and George, J. H. (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310(5751):1135–8.
- Stone, K. R., Rodkey, W. G., Webber, R., McKinney, L., and Steadman, J. R. (1992). Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. in vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *Am J Sports Med*, 20(2):104–11.
- Stone, K. R., Rodkey, W. G., Webber, R. J., McKinney, L., and Steadman, J. R. (1990). Future directions. collagen-based prostheses for meniscal regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, Mar(252):129–35.
- Stone, K. R., Steadman, J. R., Rodkey, W. G., and Li, S. T. (1997). Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. analysis of preliminary data. *J Bone Joint Surg Am*, 79(12):1770–7.
- Stratmann, A. T., Fecher, D., Wangorsch, G., Gottlich, C., Walles, T., Walles, H., Dandekar, T., Dandekar, G., and Nietzer, S. L. (2013). Establishment of a human 3d lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a boolean in silico model. *Mol Oncol*.
- Subramony, S. D., Su, A., Yeager, K., and Lu, H. H. (2013). Combined effects of chemical priming and mechanical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation on nanofiber scaffolds. *J Biomech*.
- Sweigart, M. A. and Athanasiou, K. A. (2001). Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*, 7(2):111–29.
- Toyonaga, T., Uezaki, N., and Chikama, H. (1983). Substitute meniscus of teflon-net for the knee joint of dogs. *Clin Orthop Relat Res*, 179:291–7.

- Truong, Y. B., Glattauer, V., Briggs, K. L., Zappe, S., and Ramshaw, J. A. (2012). Collagen-based layer-by-layer coating on electrospun polymer scaffolds. *Biomaterials*, 33(36):9198–204.
- Van Arkel, E. and De Boer, H. (2002). Survival analysis of human meniscal transplantations. *J Bone Joint Surg*, 84(2):227–231.
- van Osch, G. J., Mandl, E. W., Marijnissen, W. J., van der Veen, S. W., Verwoerd-Verhoef, H. L., and Verhaar, J. A. (2002). Growth factors in cartilage tissue engineering. *Biorheology*, 39(1-2):215–20.
- Verdonk, P. C., Forsyth, R. G., Wang, J., Almqvist, K. F., Verdonk, R., Veys, E. M., and Verbruggen, G. (2005). Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(7):548–60.
- Veth, R. P., den Heeten, G. J., Jansen, H. W., and Nielsen, H. K. (1983). An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus. use of synovial flaps and carbon fiber implants for artificially made lesions in the meniscus of the rabbit. *Clin Orthop Relat Res*, 181:250–4.
- Veth, R. P., Jansen, H. W., Leenslag, J. W., Pennings, A. J., Hartel, R. M., and Nielsen, H. K. (1986). Experimental meniscal lesions reconstructed with a carbon fiber-polyurethane-poly(l-lactide) graft. *Clin Orthop Relat Res*, 202:286–93.
- von der Mark, K. (1980). Immunological studies on collagen type transition in chondrogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 14(Pt 2):199–225.
- von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., and Muller, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267(5611):531–2.
- Waldman, S. D., Spiteri, C. G., Gryn timer, M. D., Pilliar, R. M., and Kandel, R. A. (2003). Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *J Orthop Res*, 21(4):590–6.
- Waldman, S. D., Spiteri, C. G., Gryn timer, M. D., Pilliar, R. M., and Kandel, R. A. (2004). Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*, 10(9-10):1323–31.
- Walles, T. (2004). Bioartificial tracheal grafts: can tissue engineering keep its promise? *Expert Rev Med Devices*, 1(2):241–50.

- Walles, T., Herden, T., Haverich, A., and Mertsching, H. (2003). Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials*, 24(7):1233–9.
- Walles, T., Weimer, M., Linke, K., Michaelis, J., and Mertsching, H. (2007). The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment. *Onkologie*, 30(7):388–94.
- Walsh, C. J., Goodman, D., Caplan, A. I., and Goldberg, V. M. (1999). Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng*, 5(4):327–37.
- Webber, R. J., Harris, M. G., and Hough, A. J., J. (1985). Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res*, 3(1):36–42.
- Weimer, M. (2006). *Entwicklung von humanen organoiden Vollhautäquivalenten für biomedizinische Testsysteme*. PhD thesis, Universität Stuttgart.
- Welsing, R. T., van Tienen, T. G., Ramrattan, N., Heijkants, R., Schouten, A. J., Veth, R. P., and Buma, P. (2008). Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant: A 2-year follow-up study in dogs. *Am J Sports Med*, 36(10):1978–89.
- Wendorff, J. H., S. A. and Greiner, A. (2012). *Electrospinning: Materials, Processing, and Applications*. John Wiley and Sons.
- Wenger, A., Stahl, A., Weber, H., Finkenzeller, G., Augustin, H. G., Stark, G. B., and Kneser, U. (2004). Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng*, 10(9-10):1536–47.
- Wintermantel, E. and Ha, S.-W. (2009). *Medizintechnik - Life Science Engineering*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Yamasaki, T., Deie, M., Shinomiya, R., Yasunaga, Y., Yanada, S., and Ochi, M. (2008). Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *Artif Organs*, 32(7):519–24.
- Yoo, J. U., Barthel, T. S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., and Johnstone, B. (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80(12):1745–57.

- Yoon, J. R., Kim, T. S., Wang, J. H., Yun, H. H., Lim, H., and Yang, J. H. (2011). Importance of independent measurement of width and length of lateral meniscus during preoperative sizing for meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med*, 39(7):1541–7.
- Zellner, J., Mueller, M., Berner, A., Dienstknecht, T., Kujat, R., Nerlich, M., Hennemann, B., Koller, M., Prantl, L., Angele, M., and Angele, P. (2010). Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A*, 94(4):1150–61.
- Zhang, Z., Arnold, J. A., Williams, T., and McCann, B. (1995). Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *Am J Sports Med*, 23(1):35–41.
- Zhang, Z. N., Tu, K. Y., Xu, Y. K., Zhang, W. M., Liu, Z. T., and Ou, S. H. (1988). Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination. *Arthroscopy*, 4(3):151–9.
- ZKRD (2012). *Deutsche Standards für die nicht verwandte Blutstammzellspende*, volume Version 8. Ulm.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D., and O’Keefe, R. J. (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest*, 118(2):429–38.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Sagittaler Schnitt eines Meniskus. Von der Gelenkkapsel her wandern Blutgefäße in die äußeren Randbereiche des Meniskus. Die ‚White-white-Zone‘ beschreibt den inneren Teil ohne Vaskularisation, während die ‚Red-red-Zone‘ Anschluss an das Blutgefäßsystem hat. Der Übergangsbereich wird als ‚Red-white-Zone‘ bezeichnet.	9
2.2	Schematische Darstellung der Organisation der wichtigsten Knorpelbestandteile Kollagen, Proteoglykane und Chondrozyten. Im rechten Ausschnitt ist der schematische Aufbau eines Proteoglykan-Aggregates dargestellt, aus (Schiller, 2004).	10
2.3	Anatomie des Gelenkknorpels, aufgezeigt ist die Zunahme an GAGs, des Druckmoduls und dem Kollagen X Anteil sowie der abnehmende Trend des Kollagen II Anteils von der oberflächlichen bis zur verkalkenden Knorpelschicht. Schematische Darstellung aus (Nguyen et al., 2011).	11
2.4	Grundprinzip des Tissue Engineerings: 1. Entnahme einer Gewebeprobe und Zellisolation, 2. Zellexpansion, 3. Besiedelung der Zellen auf eine Trägerstruktur und 4. Kultivierung des Gewebeersatzmodells im Bioreaktor, 5. Verwendung als Implantat oder 6. als Testsystem.	14
2.5	Schematischer Aufbau einer Elektrospeinning Apparatur. (A) Typischer vertikaler Aufbau und (B) Horizontaler Aufbau, aus (Bhardwaj and Kundu, 2010). . .	20
2.6	Eine Auswahl an Markern, die spezifische Stadien der Chondrogenese festlegen. Das Expressionsmuster der verschiedenen Faktoren hilft das Entwicklungsstadium zu bestimmen, modifiziert aus (Zuscik et al., 2008).	23
4.1	Aufbau der Elektrospeinning-Anlage, zur Herstellung von Kol I/II ES-Scaffolds. Der Kollektor, eine rotierende Welle, die über einen Motor angetrieben wird, ist zwischen zwei Polymerspritzen aufgebaut. Spritzenpumpen fördern die Polymerlösung durch Edelstahlkanülen, die an einem Hochspannungsgenerator angeschlossen sind. Durch die angelegte Spannung bildet sich ein Kollagenjet, über diesen feine Fasern auf dem Kollektor landen.	68

- 4.2 Herstellung einer biologisch vaskularisierten Matrix (BioVaSc®). (A) Explan-
tation der BioVaSc®. (B) Teilsegment eines porcinen Jejunums mit arteriellem
und venösem Anschluss. (C) Die BioVaSc® nach Dezellularisierung, die erhal-
tenen Röhrenstrukturen der Arterien und Venen sind gut zu erkennen. 74
- 4.3 Skizze des Versuchsaufbaus der 2D Ko-Kulturmodelle. (A) Einspannen und (B)
Besiedelung der Matrices in Zellkronen. (C) Zellanordnung auf der Matrix. . . . 76
- 4.4 Abbildung aller verwendeten 3D Kollagen Scaffolds. (A) Bio-Gide Membran,
(B) BD Scaffold, (C) Bio-Mesh Matrix, (D) Kollagen I Hydrogel und (E) Kol-
lagen I ES-Matrix. 76
- 4.5 Schema der dynamischen Kultur und Aufbau eines 3D Meniskuskonstrukts.
(A) Schematische Abbildung des Bioreaktors zur dynamischen Kultur. (B) Das
Meniskuskonstrukt wird im Bioreaktor kultiviert. (C) Das Gefäßnetz wird der
BioVaSc® wird mit mvEZ rebesiedelt. (D) Nach zwei Wochen Rebesiedelungs-
kultur wird ein Kollagen-Typ-I-Hydrogel mit MZ in das Lumen der BioVaSc®
gegeben und eine Kokultur etabliert. 81
- 4.6 Skizze des Bioreaktormodells mit allen Bauteilen als Zusammenbau dargestellt. 115
- 5.1 Färbungen eines humanen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen.
(A-D) stellt den äußersten Bereich dar, (E-H) den oberen Rand des middle-
ren Bereichs, (I-L) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (M-P) das
innerste Drittel. (A,E,I,M) zeigt die HE Färbung. Eine positive Färbung von
vWF (B,F,J,N) und CD31 (C,G,K) ist ausschließlich im äußeren Bereich zu
finden. VEGF (D,H,L,P) färbt Zellen positiv im äußersten Bereich und am
Rand an.(blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung). 120
- 5.2 Färbungen eines porcinen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen.
(A-D) stellt den äußersten Bereich dar, (E-H) den oberen Rand des mittleren
Bereichs, (I-L) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (M-P) das inner-
ste Drittel. (A,E,I,M) zeigt die HE Färbung. Eine positive Färbung von vWF
(B,F,J,N) und CD31 (C,G,K) ist ausschließlich im äußeren Bereich zu finden.
VEGF (D,H,L,P) färbt Zellen positiv im äußersten und innersten Bereich sowie
am Rand an.(blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung). . . . 121

- 5.3 Färbungen eines humanen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-E) stellt den äußersten Bereich dar, (F-J) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (K-O) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (P-T) das innerste Drittel. (A,F,K,P) zeigt die Pentachrom Färbung, (B,G,L,Q) die immunhistologische Färbung von Aggrekan, (C,H,M,R) von Kol I, (D,I,N,S) von Kol II und (E,J,O,T) die von Kol X. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung). 122
- 5.4 Färbungen eines porcinen Meniskusgewebes von unterschiedlichen Bereichen. (A-E) stellt den äußersten Bereich dar, (F-J) den oberen Rand des mittleren Bereichs, (K-O) den unteren Rand des mittleren Bereichs und (P-T) das innerste Drittel. (A,F,K,P) zeigt die Pentachrom Färbung, (B,G,L,Q) die immunhistologische Färbung von Aggrekan, (C,H,M,R) von Kol I, (D,I,N,S) von Kol II und (E,J,O,T) die von Kol X. (blau=Gegenfärbung; rot=spezifische Antikörpermarkierung). 123
- 5.5 Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen und porcinen mvEZ. Zellen an Tag 2 (A),(B) und Tag 12 (C),(D) nach der Isolation (Passage 0). 125
- 5.6 Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen und porcinen MZ. Zellen an Tag 2 (A),(B) und Tag 12 (C),(D) nach der Isolation (Passage 0). 126
- 5.7 Immunhistochemische Charakterisierung der hMZ auf Cytospots aus Ko-Kultur mit hmvEZ (A-D) und Mono-Kultur (E-H) auf PET Membranen. Die Isotypkontrollen sind in jeder rechten oberen Bildecke zu sehen. (blau=Gegenfärbung; braun=spezifische Antikörpermarkierung). 127
- 5.8 Immunhistochemische Charakterisierung der hMZ aus Ko-Kultur mit hmvEZ (A-D) und Mono-Kultur (E-H) auf CCC Trägermatrices. Die Isotypkontrollen sind in jeder rechten oberen Bildecke zu sehen. (blau=Gegenfärbung; braun=spezifische Antikörpermarkierung). 128
- 5.9 Zellwachstum von humanen MZ auf unterschiedlichen Biomaterialien auf Kollagenbasis. (A) BD 3D Scaffold, (B) Geistlich Kollagen-Membran, (C) BioMesh-Matrix (D) Kollagen Typ I Hydrogel, (E) Kol I ES-Matrix, (F) Kol I/II ES-Matrix. (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern. 129
- 5.10 Vitalitätsanalyse mittels MTT Test drei erfolgreich rebesiedelter BioVaSc® mit hmvEZ nach 14 Tagen Mono-Kultur (ersten beiden Zeilen) und anschließend weitere 7 Tage Ko-Kultur mit hMZ im Hydrogel (dritte Zeile). Versuch 1 (A-C), Versuch 2 (D-F), Versuch 3 (G-I), Versuch 4 (J-L) und Versuch 5 (M,N). (blau=vitale Zellen). 130

- 5.11 MTT Test statischer Mono-Kulturen von Hydrogelen mit hMZ im Zentrifugenröhrchen (A) und pMZ in einem azellularisierten, nicht besiedelten BioVaSc[®] Stück (B). Die Vitalität der MZ in den statischen Kontrollen ist deutlich reduziert im Gegensatz zu den dazugehörigen dynamischen 3D Ko-Kultur Meniskuskonstrukten (A'),(B'). (blau=vitale Zellen). 133
- 5.12 Verbindung und Integration der MZ und der mvEZ in der BioVaSc[®]. (A) zeigt ein Bild am Ende der Kulturdauer. (B,C) MTT Test des Konstrukts, wobei ausgewanderte vitale MZ auf der BioVaSc[®] sowie vitale mvEZ in den Gefäßstrukturen zu erkennen sind. (D) zeigt die HE Färbung im Querschnitt. . 134
- 5.13 Immunhistologische Färbung von vWF einer nicht besiedelten BioVaSc[®] (A) und einer erfolgreich rebesiedelten BioVaSc[®] mit hmvEZ (B,C). Zu erkennen sind ausgekleidete Gefäßstrukturen der BioVaSc[®] mit vWF-positiven Zellen (Pfeile) nach Mono-Kultur (B) und Ko-Kultur (C) von hmvEZ mit hMZ.(A) zeigt keine positive Färbung (blau=Gegenfärbung, braun=spezifische Antikörpermarkierung). 135
- 5.14 Übersichtsfärbungen und immunhistologische Färbungen des 3D Meniskuskonstrukts mit Zellen humanen Ursprungs. Dargestellt sind für jede Färbung zwei unterschiedliche Probenbereiche. (A) bis (I) stellt den äußeren Bereich dar, (A') bis (I') den Bildausschnitt des inneren Bereichs (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die BioVaSc[®] wurde mit BV gekennzeichnet, das Hydrogel mit HG, um sie im Bild besser zu erkennen. 136
- 5.15 Übersichtsfärbungen und immunhistologische Färbungen des 3D Meniskuskonstrukts mit Zellen porcinen Ursprungs. Dargestellt sind für jede Färbung zwei unterschiedliche Probenbereiche. (A) bis (I) stellt den äußeren Bereich dar, (A') bis (I') den Bildausschnitt des inneren Bereichs (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die BioVaSc[®] wurde mit BV gekennzeichnet, das Hydrogel mit HG, um sie im Bild besser zu erkennen. 138

- 5.16 Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. (A) ist die Ölrotfärbung der adipogen differenzierten hMSZ, (B) zeigt die Alizerinrot Färbung, die die Knochensubstanzen der osteogenen Differenzierung anfärbt. In (C) sind hMSZ aus Passage 3 an Tag 3 im Hellfeld dargestellt. Die Alcianblau Färbung der chondrogen differenzierten Zellpellets zeigt in der Differenzierungskultur eine deutliche Proteoglykansynthese, dargestellt in blau (D), während das in Stammzellmedium kultivierte Pellet keine Proteoglykanproduktion aufweist (G). (blau=saure Proteoglykane, rot=Gegenfärbung) (E,H) zeigen die immunhistologischen Färbungen von Kol II und (F,I) die Isotypkontrolle (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die Pellets wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium (D-F) sowie in Stammzellmedium MSCGM-CDr (G-I) kultiviert und nach 3 Wochen fixiert und gefärbt. 141
- 5.17 Differenzierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen. (A) ist die Ölrotfärbung der adipogen differenzierten pMSZ, (B) zeigt die Alizerinrot Färbung, die die Knochensubstanzen der osteogenen Differenzierung anfärbt. In (C) sind frisch isolierte pMSZ an Tag 10 im Hellfeld dargestellt. Die Alcianblau Färbung der chondrogen differenzierten Zellpellets zeigt in der Differenzierungskultur eine deutliche Proteoglykansynthese, dargestellt in blau (D), während das in Stammzellmedium kultivierte Pellet keine Proteoglykanproduktion aufweist (G). (blau=saure Proteoglykane, rot=Gegenfärbung) (E) zeigt die immunhistologische Färbung von Kol II und (F) die Isotypkontrolle (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). Die Pellets wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert und nach 3 Wochen fixiert und gefärbt. 142
- 5.18 Zellwachstum von humanen MSZ auf unterschiedlichen Biomaterialien auf Kollagenbasis. (A) BD 3D Scaffold. (B) Geistlich Kollagen-Membran, (C) BioMesh Matrix (D) Kollagen-I-Hydrogel, (E) Kol I ES-Matrix, (F) Kol I/II ES-Matrix (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern). 143
- 5.19 REM Aufnahmen der Kol I Fasern auf der Außen-/ Oberseite der elektrogesponnenen Kollagenmatrix M121031 vor dem Crosslinken bei unterschiedlichen Vergrößerungen: x200 (A), x500 (B) und x1000 (C) (Beschleunigungsspannung 5 kV, Arbeitsabstand 14 mm). 144
- 5.20 REM Aufnahmen von der Innenseite (Mittelschicht) des Scaffolds M121017 vor dem Crosslinken bei einer Vergrößerung x200 (A), x500 (B) und x1000 (C) (Beschleunigungsspannung 5 kV, Arbeitsabstand 13 mm). 144
- 5.21 (A) Darstellung der unterschiedlichen Faserausrichtungen in den einzelnen Matrixschichten. (B) HE Färbung eines 3h gecrosslinkten ES-Scaffolds (rosa=Matrix, blau=Zellkern). 145

- 5.22 (A,B): REM Aufnahmen der Kol I Fasern. (A,C,G) zeigt das Scaffold nach 1h, (D,H) nach 2h, (E,I) nach 3h und (B,F,J) nach 4h Crosslinkdauer in 10% HMDI. (C) bis (J) zeigt eine HE Färbung der nicht besiedelten Scaffolds im Querschnitt, wobei (C) bis (F) die Scaffolds an d0 und (G) bis (J) nach 7 Tagen in Medium darstellt (rosa=Matrix, blau=Zellkern). 146
- 5.23 Migration Dil-gelabelter humaner mesenchymaler Stammzellen auf elektrogewebener Kollagen Typ I/II Matrix 1 Tag (A,E,I,M), 3 Tage(B,F,J,N), 4 Tage (C,G,K,O) und 7 Tage (D,H,L,P) nach der Besiedelung (orange=Dil Fluoreszenzfarbstoff, blau=DAPI Zellkern). 147
- 5.24 Lebend-Tot-Färbung humaner mesenchymaler Stammzellen auf elektrogewebener Kollagen Typ I/II Matrix 7 Tage nach der Besiedelung. Es können lebende Zellen im Inneren der Matrix beobachtet werden, während einige tote Zellen am Rand der Matrix auszumachen sind (rot=tote Zellen, grün=lebende Zellen, blau=DAPI Zellkern). 149
- 5.25 Zellfreie Kol I/II ES-Matrix (1h gecrosslinkt). Es lassen sich keine Zellkerne sowie spezifische, positive Färbungen erkennen, weder in (A) der Alcianblau-Färbung, noch in (B) der immunhistologischen Färbung von Kol II. (C) zeigt die Isotypkontrolle. 150
- 5.26 Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=1h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ14, P1. Ein gutes Zelleinwachsen lässt sich bereits nach 7 Tagen statischer Kultur erkennen (A,E,I) (HE Färbung, rosa=Zellmembran, blau=Zellkern). Die Glykosaminoglykansynthese in der Alcianblau-Färbung (B,F,J) nimmt über die Kulturdauer von insgesamt 21 Tagen stetig zu (rot=Gegenfärbung, blau=saure Glykosaminoglykane). Kol I (C,G,K) und Kol II (D,H,L) zeigen an allen untersuchten Zeitpunkten eine positive Färbung, die Isotypkontrollen verbleiben durchweg negativ (blau=Gegenfärbung, rot=spezifische Antikörpermarkierung). 151
- 5.27 Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ16, P1, kultiviert in vier unterschiedlichen Kulturmedien, histologische Analysen. (A-D) HE Färbung, (E-H) Alcianblau Färbung. 152
- 5.28 Kol I/II ES-Matrix (M110216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ16, P1, kultiviert in vier unterschiedlichen Kulturmedien, immunhistologische Analysen. Kol I (A-D), Kol II (E-H), Sox9 (I-L), Aggrekan (M-P), RunX2 (Q-T) und Kol X (U-X). 153
- 5.29 Kollagen I/II ES-Matrix (M120216, Crosslinkzeit=3h), besiedelt mit $0,5 \cdot 10^6$ hMSZ27, P3. PCR Analysen der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf einer elektrogewebenen Kollagen Typ I/II Matrix. (A) Aggrekan, (B) Kol II, (C) MMP3, (D) Kol I, (E) Kol X, (F) Ef1a. 155

-
- 5.30 (A) GAG Gehalt, (B) DNA Gehalt, (C) GAG normalisiert auf DNA von hMSZ, kultiviert auf Kol I/II ES-Matrices nach 7, 14 und 21 Tagen. GAG/DNA reduziert sich im Stammzellmedium mit der Zeit, während im chondrogenem Differenzierungsmedium ein Anstieg zu verzeichnen ist. 157
- 5.31 (A) Schematische Darstellung der Baugruppe des Bioreaktormodells. (B) Gefertigter Bioreaktor aus Bauteilen aus PEEK, PC und V4A Stahl. Durch den austauschbaren, oberen Probestisch können alle Arten an Biomaterialien mechanisch stimuliert werden. 158
- 6.1 3D Meniskuskonstrukt mit angefärbtem Blutgefäßsystem. 177

Tabellenverzeichnis

2.1	Oberflächenmarker für die Stammzellpopulation	21
3.1	Übersicht der verwendeten Zellen und den Spenderdaten	31
3.2	Primersequenzen zur Genexpressionsanalyse	33
3.3	Materialien für RNA-Isolation, reverse Transkription und PCR	33
3.4	Komponenten für den cDNA-Synthese MasterMix Ansatz	34
3.5	Komponenten für PCR-Ansatz	34
3.6	In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper	34
3.7	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie	35
3.8	Kultivierungsmedien für die Zellkultur	36
3.9	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	37
3.10	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien	38
3.11	In dieser Arbeit eingesetzte Laborgeräte	41
3.12	In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	44
4.4	Bezeichnung der verwendeten ES-Scaffolds	69
4.13	PCR-Temperaturprotokoll	107
4.18	Materialanforderung und Stückliste für die Fertigung des Bioreaktors.	115
5.1	Zusammenfassung der Markerexpression von hMZ in Mono- und Ko-Kultur auf PET bzw. CCC Membranen.	128
5.2	Gefäßsystembesiedelung mit mvEZ und mikroskopische Bewertung der Zellmigration, sowie Bewertung der Vitalität der MZ im Hydrogel, Versuche 1 bis 5.	132
5.3	Zusammenfassung der Markerexpressionen der untersuchten Medien und unterschiedlichen Zeitpunkten.	156

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jenny Weyhmüller Reboredo
Geburtstag:

Ausbildung

Grundschule: 1990 - 1994 Michael-Beheim Schule Obersulm
Gymnasium: 1994 - 2004 Justinus-Kerner Gymnasium Weinsberg
Allgemeine Hochschulreife
08.2001 - 07.2002 Privatschule „15 de Septiembre“ Tegucigalpa (Honduras)
Universität: 2004 - 2010 Universität Stuttgart
Diplomstudiengang Technologiemanagement
Hauptfächer Medizinische Verfahrenstechnik und Lasertechnik

Praktische Erfahrungen

KS Kolbenschmidt GmbH, Neckarsulm
05.07. - 30.07.2004 Praktikum im Bereich industrielle Fertigung und Fertigungsverfahren
23.08. - 03.09.2004 Praktikum im Konstruktions- und Umweltschutzbüro

	Institut für Leistungselektronik und elektrische Antriebe ILEA, Universität Stuttgart
01.05. - 31.08.2006	Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin Institut für Textil- und medizinische Verfahrenstechnik ITV, Denkendorf
11.2007 - 01.2008	Mitarbeit bei einem Projekt der Gruppe Smart Textiles in Kooperation mit der Fakultät für Gestaltung der Hochschule Pforzheim Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstech- nik IGB, Stuttgart
05.2008 - 08.2008	Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Zellsysteme Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik ILM, Ulm
08.2008 - 02.2009	Studienarbeit „Bleaching von Zähnen mit einem Nd:YAG Laser in vitro“ TRUMPF Photonics Inc., Cranbury, New Jersey (USA)
03.2009 - 08.2009	Fachpraktikum in der Abteilung Optical Components Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstech- nik IGB, Stuttgart
10.2009 – 04.2010	Diplomarbeit „Entwicklung eines Bioreaktors für die automatisierte Zellkultur“ Diese Diplomarbeit wurde von der LEWA GmbH, Leonberg mit dem LEWA Preis 2010 ausgezeichnet. Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin LTERM, Universitätsklinikum Würzburg
seit 05.2010	Promotion „Tissue Engineering eines Meniskus - Vom Biomaterial zum Implantat“

Fortbildungen/ Seminare

1. "Laser in der Medizin" (ILM, Universität Ulm (05.11.2008))
2. „Projektmanagement - Projekte an der Universität gestalten“ (Dr. Geibig-Wagner (21.07.2011))
3. „Project Management in the Biotech Industry“ (Dr. Anil Jain (07.10.2011))
4. „Poster Design and Presentation“ (Dr. Barry Drees (24.11.2012))
5. „Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde“ (Universität Würzburg (18.-22.02.2013))
6. „Writing Scientific Publications“ (Dr. Christina Schütte (06.-07.03.2013))
7. „Giving Academic Talks“ (Dzifa Vode (16.-17.04.2013))
8. „Kompetenz zeigen - Vertrauen schaffen“ (Stefan Spies (29.-30.04.2013))

Mein herzlicher Dank geht an...

Prof. Dr. Heike Walles für die kompetente und methodische Betreuung, für die stetige Unterstützung und Förderung, sowie für die Mitnahme als erste Doktorandin und die Übernahme als Post-Doktorandin in ihr Würzburger Team. Danke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und das wertvolle Feedback, das du mir gegeben hast. Du hast mich motiviert und mir viele Tipps mit auf den Weg gegeben, von denen ich sicherlich in meiner Zukunft profitieren werde!

Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter.

Prof. Dr. Thomas Hirth und **Prof. Dr. Thomas Hünig** für die Betreuung meiner Arbeit als Mitglied des Promotionskomitees.

Prof. Dr. Maximilian Rudert, **Prof. Dr. Andre Steinert** und **Prof. Dr. Ulrich Nöth** von der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg für die Bereitstellung humaner Spongiosa und humanen Meniskusgewebe, sowie für die wertvollen Tipps und Hilfestellungen seitens der medizinischen Anwendung.

Dem Team vom MCW, **Dr. Lars Rackwitz** und **Sebastian Schürlein** für die Hilfestellung im Elektrosinning und dafür, dass ich Eure Geräte mitbenutzen durfte.

Dipl.-Ing. Thomas Schwarz und **Dr.-Ing. Jan Hansmann** für die Unterstützung bei technischen Fragen bezüglich des Bioreaktors. Es macht Spaß, mit Euch zusammen zu arbeiten!

Sylvia Murawicki für die gut gelungenen Gelelektrophoresen. Danke, dass du sowohl methodisch als auch freundschaftlich mir immer zur Seite stehst!

Carolin Tripp, **Christa Amrehn**, **Sabine Graiff** und **Sabine Wilhelm** für eure Hilfe im Labor und eure Zeit, die ihr euch genommen habt, mir Methoden zu erklären!

Christoph Rücker, Dorothee Mugele, Conny Unger, Isabel Stalter, Amelie Glunz und Andrea Schwab für eure tollen Abschlussarbeiten. Es war und ist mir eine Freude, Euch betreuen zu dürfen und mein Wissen weiterzugeben!

Corinna Moll, Katharina Taichrib, Szymon Kurdyn, Holger Kirch, Antje Appelt-Menzel, David Fecher und dem ganzen Team des Lehrstuhls für eine unschlagbar spitzen Arbeitsatmosphäre. Ihr seid ein super Team! Ich bin froh und glücklich, mich sowohl fachlich als auch freundschaftlich mit Euch austauschen zu können!

Mama und Papa, die immer hinter mir stehen, mich unterstützen, an mich glauben und für mich da sind. Ihr gebt immer alles, was ihr geben könnt und stellt für mich die Welt auf den Kopf.

Meinen Bruder Tim Weyhmüller und seine Frau **Madeleine Weyhmüller**, die für mich da sind, wenn ich sie brauche und mich in allen Lebenslagen unterstützen.

Pedro Reboredo für die unermüdliche Unterstützung, die Motivation, den Rückhalt und die herzlichen Umarmungen, die mir immer Kraft geben. Danke für die schönen Stunden nach der Arbeit und die witzigen Momente in meinem Leben. Danke für dein großes Vertrauen, dafür dass du mein bester Freund, mein Mann und bald der beste Papa der Welt bist!