

Aus dem Universitätsklinikum Heidelberg
Zentrum für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie

Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie
Leitung: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

**Biologische Mechanokompetenz von humanem Knorpelersatz-
gewebe: die Rolle von Zellherkunft und Signalkaskaden**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
der
Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von
Janine Lückgen

aus
Leverkusen

2022

Dekan:
Doktormutter:

Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans-Georg Kräusslich
Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Für meinen Großvater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Knorpelaufbau	1
1.2 Knorpelentstehung	2
1.3 Funktion von artikulärem Knorpel.....	3
1.3.1 Mechanokopplung	6
1.3.2 Mechanotransduktion	7
1.3.3 Mechanoadaptierung.....	10
1.4 Knorpel Tissue Engineering	18
1.4.1 Zellquellen im Knorpel Tissue Engineering	19
1.5 Funktionelles Knorpel Tissue Engineering	22
1.5.1 Mechanische Belastung von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe	23
1.5.2 Mechanische Belastung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	28
1.6 Knorpelschäden und -degeneration	31
1.6.1 Knorpeldefekte und zellbasierte Knorpeltherapien.....	32
1.6.2 Osteoarthritis	33
1.7 Zielsetzung	35
2 Materialien.....	36
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	36
2.2 Radioaktive Isotope	37
2.3 Wachstumsfaktoren und Enzyme.....	37
2.4 Agonisten und Inhibitoren.....	38
2.5 Antikörper	38
2.5.1 Durchflusszytometrie	38
2.5.2 Histologie	38
2.5.3 Western Blot	38
2.6 Kits.....	39
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.8 PCR-Primer	40
2.9 TaqMan® MicroRNA Assays.....	40
2.10 Puffer und Lösungen	41
2.10.1 Allgemeine Puffer	41
2.10.2 Zellkultur	41
2.10.3 Histologische Analysen.....	41
2.11 Molekularbiologische Analysen	42
2.11.1 Agarose Gelelektrophorese	42
2.11.2 mRNA-Isolation aus Pellets.....	42
2.12 Biochemische Analysen	42
2.12.1 Glykosaminoglykanmessung	42
2.12.2 SDS-PAGE	42
2.12.3 Western Blot	42
2.13 Zellkulturmedien	43

2.14 Geräte	43
2.15 Software	44
3 Methoden	45
3.1 Rechtliche und ethische Aspekte der Studie	45
3.2 Gewebeisolation, Zellgewinnung und Expansion	45
3.2.1 Gelatinebeschichtung von Zellkulturflaschen.....	45
3.2.2 MSC Isolation aus Knochenmarkaspiraten.....	45
3.2.3 Native Knorpelbiopsien und Isolierung humaner Chondrozyten.....	46
3.2.4 Passagieren von Zellen	47
3.2.5 Kryokonservierung von Zellen	47
3.2.6 Auftauen von Zellen	47
3.2.7 Durchflusszytometrie	48
3.2.8 Differenzierung von MSC in die adipogene und osteogene Linie	48
3.2.9 Chondrogene Differenzierung von MSC in Pelletkultur	48
3.3 Herstellung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	49
3.3.1 Zellbesiedlung von Kollagenträgern.....	49
3.3.2 Herstellung von osteochondralem Ersatzgewebe mittels Tissue Engineering	49
3.4 Mechanische Stimulation der Knorpelersatzgewebe im Bioreaktor.....	50
3.5 Histologische Analysen.....	51
3.5.1 Ölrot O Färbung	51
3.5.2 Alizarin Rot S Färbung.....	51
3.5.3 Fixierung von Knorpelersatzgewebe.....	52
3.5.4 Anfertigen histologischer Schnitte.....	52
3.5.5 Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydrierung von Schnitten.....	52
3.5.6 Safranin O-Färbung	53
3.5.7 Immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ II	53
3.6 Härtemessung.....	53
3.7 Isotopen-Einbau zur Messung der GAG- und Kollagen-Neusynthese	54
3.8 Biochemische Analysen.....	55
3.8.1 Glykosaminoglykan-Messung in Knorpelersatzgewebe	55
3.8.2 DNA-Messung in Knorpelersatzgewebe	55
3.8.3 Herstellung von Proteinlysaten	55
3.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	56
3.8.5 SDS-PAGE	56
3.8.6 Western Blot	56
3.9 ELISA.....	57
3.9.1 PGE ₂ -ELISA.....	57
3.9.2 cAMP ELISA	58
3.10 Molekularbiologische Analysen.....	58
3.10.1 Gesamt-RNA Isolation	58
3.10.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	59
3.10.3 Reinigung der Gesamt-RNA aus Knorpelersatzgewebe für mRNA Analysen	59
3.10.4 mRNA-Isolation aus Pellets	60
3.10.5 Reverse Transkription von mRNA	60
3.10.6 Reverse Transkription von miR.....	60
3.10.7 Quantitative Real-Time PCR.....	61
3.10.8 Auswertung der qRT-PCR	62
3.10.9 Agarose-Gelelektrophorese	62
3.11 Statistik	62
4 Ergebnisse	63

4.1 Etablierung von Knorpelersatzgewebe aus MSC	63
4.1.1 Charakterisierung von MSC aus Knochenmarkspiraten.....	63
4.1.2 Wahl einer geeigneten Knochenersatzphase für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe	66
4.2 Charakterisierung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	67
4.2.1 Mechanokopplung während der gewählten Belastungsepisode	71
4.3 Mechanotransduktion in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	72
4.3.1 Die Regulation der Integrinexpression nach mechanischer Belastung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	72
4.3.2 Die Aktivierung von pERK1/2 in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch mechanische Belastung.....	74
4.3.3 Die belastungsinduzierte Expression mechanosensitiver Gene in AC- und MSC- basiertem Knorpelersatzgewebe	75
4.3.4 Die Mechanoregulation von microRNAs in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	78
4.4 Mechanoadaptierung in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	79
4.4.1 Einfluss physiologischer Belastung auf die EZM-Synthese in AC- und MSC- basiertem Knorpelersatzgewebe	79
4.4.2 Einfluss physiologischer Belastung auf die Aktivität anaboler Signalwege in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	81
4.4.3 Der Einfluss des anabolen BMP-Signalwegs auf die EZM-Syntheserate von AC und MSC-basierten Chondrozyten	83
4.4.4 Untersuchung der Rolle kataboler Signalwege in AC und MSC-basierten Chondrozyten	84
4.4.5 Untersuchung des Einflusses mechanischer Belastung auf Signale mit anaboler und kataboler Wirkung.....	91
4.5 Einfluss mechanischer Belastung auf den Zellphänotyp	102
4.5.1 Expression hypertropher und osteogener Marker in AC und MSC-basierten Chondrozyten	102
4.5.2 Einfluss der Belastung auf die Expression hypertropher und osteogener Marker in MSC-basierten Chondrozyten	104
4.5.3 Normalisierung der Expression hypertropher und osteogener Marker auf COL2A1	105
4.5.5 Einfluss einer PTHrP-Stimulation auf die Expression hypertropher und osteogener Marker.....	106
5 Diskussion	109
5.1 Beurteilung der Qualität des hergestellten Knorpelersatzgewebes.....	110
5.1.1 Einfluss der Knochenersatzphase auf die GAG-Ablagerung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe	110
5.2 Wahl der Belastungsbedingungen.....	112
5.3 Evaluierung von Mechanokopplungsparametern in Knorpelersatzgewebe.....	114
5.4 Evaluierung von Mechanotransduktionsparametern in Knorpelersatzgewebe.....	115
5.5 Evaluierung von Mechanoadaptierungsparametern in Knorpelersatzgewebe	117
5.5.1 Einfluss von anabolen Signalwegen auf die EZM-Synthese	118
5.5.2 Einfluss von katabolen Signalwegen auf die EZM-Synthese	119
5.5.3 Einfluss von Signalwegen mit anaboler und kataboler Wirkung auf die EZM- Synthese.....	121
5.6 Einfluss mechanischer Belastung auf den Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten	125
5.7 Limitierungen der Studie.....	126
5.8 Fazit und Ausblick	127

Inhaltsverzeichnis

6 Zusammenfassung	128
7 Literaturverzeichnis.....	130
Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung	X
Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	X
Anhang	XIII
Lebenslauf	XV
Danksagung.....	XVI
Eidesstattliche Versicherung	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
³⁵ SO ₄	35S-Sulfat
3D	Dreidimensional
AC	Artikuläre Chondrozyten
ACAN	Aggrekan (Genname)
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
ADB	<i>Agarose Dissolving Buffer</i>
AKT	Proteinkinase B
akt.	Aktiv
ALK	<i>Activin Receptor-Like Kinase</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
AP	<i>Activator Protein</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AXUD1	<i>Axin1 Up-Regulated 1</i>
Bay	Bay11-7082
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
Bq	Becquerel
BRE	<i>SBE BMP Responsive Element</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Zenti
c-Fos/FOS	<i>V-fos FBJ Murine OsteoSarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFU-F	<i>Colony-Forming Unit Fibroblasts</i>
CHSY1	Chondroitinsulfatsynthase
Ci	Curie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL10A1	Kollagen Typ X (Genname)
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Thrombospondin-5</i>
COX2/PTGS2/PTHS2	Cyclooxygenase 2/Prostaglandinsynthase 2
cpm	<i>Counts per minute</i>
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
cAMP	cycloAMP
dbcAMP	dibutyryl-cycloAMP
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
<i>DUSP</i>	<i>Dual Specificity Phosphatase</i>
E	Effizienz
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Prostaglandin E-Rezeptor
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
et al.	Und andere (et alii)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>FOSB</i>	<i>FBJ Murine OsteoSarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
g	Gramm
G/C	Guanin/Cytosin
GAG	Glykosaminoglykan
GDF	<i>Growth/Differentiation Factor</i>
Gas	Gs alpha-Untereinheit
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IBSP	<i>Bone Sialo Protein</i>
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IKKB	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
(i)NOS	<i>(Inducible) Nitric Oxide Synthase</i>
I κ B	<i>Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor</i>
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
k	kilo
kDa	Kilodalton
Koll	Kollagen
Kompr.	Kompression
Ktrl	Kontrolle
L	Liter
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
LDN	LDN212854
LiCl	Lithium Chlorid
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LTBP	<i>Latent TGF-beta Binding Protein</i>
M	Molar/Mega

m	Milli/Meter
MACI/T	<i>Matrix-associated Autologous Chondrocyte Implantation/Transplantation</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
max.	maximal
MDL	MDL-12,330A
MEF2C	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>
microRNA/miR	microRibonukleinsäure
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stroma/Stammzellen
N	Newton
n	Nano
NFκB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NR4A	<i>Nuclear Receptor 4A</i>
NSAIDs	<i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
OA	Osteoarthrose
OD	Optische Dichte
Ölrot O	Ölrot Orange
P	Passage
p	Pico, phospho
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGES	PGE-Synthasen
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
Pi	Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
pNpp	para-Nitrophenylphosphat
PPi	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH-Rezeptor
PTHrP/PTHLH	<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>
PTPRC	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
Rel.	Relativ
RT	Reverse Transkriptase
RUNX2	<i>Runt Related Transcription Factor 2</i>
s	Sekunde

Abkürzungsverzeichnis

Safranin O/Saf. O	Safranin Orange
SBE	<i>SMAD Binding Element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEK1	JNK Kinase 1
SMAD	<i>SMA and Mothers Against Decapentaplegic</i>
SOX9	<i>Sex Determining Region y-box 9</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TE	Tissue Engineering/Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGFBR	TGF- β -Rezeptor
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Proteinase</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
U	Units
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
VLRH	<i>Very Low Rubber Hardness</i>
w/v	Gewichtsanteil
x g	G-Kraft
z.B.	Zum Beispiel
β -TCP	β -Trikalziumphosphat
μ	Mikro

1 Einleitung

1.1 Knorpelaufbau

Skelettgewebe ist von der Embryonalentwicklung bis zum Tod mechanischen Einflüssen ausgesetzt. Besonders stark unterliegen die Gelenke einer mechanischen Belastung durch die Bewegung. Die Knochen werden durch eine wenige Millimeter dicke hyaline Knorpelschicht abgeschlossen, die maßgeblich die auf das Gelenk wirkenden mechanischen Kräfte absorbiert und eine gleitende Gelenkbewegung ermöglicht. Dies geschieht über einen hohen Anteil an Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM), die etwa 20-40 % des Gesamtgewichts des Knorpels ausmachen. Davon bestehen 10-20 % aus Kollagen und 5-10 % aus Proteoglykanen (Mow und Huiskes 2005). Die einzig vorhandene Zellart, die Chondrozyten, macht nur 1-5 % der Knorpelmasse aus, während Wasser die restlichen 60-80 % ausmacht (Stockwell 1967).

Kollagene dienen der Zugfestigkeit des Knorpels und bestimmen Härte und Steifigkeit des Knorpels. Somit beeinflussen sie seine biomechanischen Eigenschaften. Fibrilläre Kollagene setzen sich aus drei ineinander linksgedrehten α -Ketten zusammen, die gemeinsam eine rechtsgedrehte Tripelhelix formen. Die Aminosäuresequenz besteht aus der Abfolge Glycin-X-Y, wobei X meistens Prolin und Y 4-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin ist (Engel et al. 1977). Daher ist es möglich, mithilfe radioaktiver Isotopenmarkierung durch ^3H -Prolin die Kollagen-Neusynthese experimentell zu quantifizieren.

Das Hauptkollagen in hyalinem Knorpel ist Kollagen Typ II, ein Homotrimer von $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten, die durch das Gen *COL2A1* exprimiert werden. Daneben bilden weitere knorpelspezifische Kollagene wie Kollagen Typ IX und Kollagen Typ XI gemeinsam mit Kollagen Typ II das fibrilläre Netzwerk.

Kollagen Typ X (Genname *COL10A1*) hingegen befindet sich in der tiefen, hypertrophen und kalzifizierten Zone des artikulären Knorpels am Übergang zum subchondralen Knochen. Es handelt sich um ein Homotrimer bestehend aus $\alpha 1(\text{X})$ Ketten (Eyre 1991).

Proteoglykane dienen der Druckstabilität des Knorpels. Proteoglykane sind hoch glykosylierte Proteinmonomere, die aus einem Kernprotein mit einer oder mehreren kovalent gebundenen linearen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten bestehen. Im Knorpel machen sie den zweitgrößten Anteil der Makromoleküle der EZM aus. Die GAG-Ketten können aus über hundert sulfatierten Monosacchariden bestehen und bleiben durch ihre negative Ladung aufgrund der Ladungsabstoßung voneinander separiert (Sophia Fox et al. 2009). Durch den hohen Sulfatierungsgrad ist es möglich, die Neusynthese von Proteoglykanen experimentell mithilfe radioaktiver Isotopenmarkierung durch ^{35}S -Sulfat ($^{35}\text{SO}_4$) zu quantifizieren. Das längste Proteoglykan, das gleichzeitig den größten Gewichtsanteil der im Knorpel vertretenen Proteoglykane ausmacht, ist Aggrekan (Genname *ACAN*). Aggrekan enthält mehr als 100 Chondroitinsulfat-

und Keratansulfatketten. Aggrecan befindet sich im interfibrillären Raum der EZM und dient vor allem dem osmotischen Widerstand bei Kompression des Knorpels.

Ein weiteres Matrixprotein im Knorpel ist *Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)*, auch als Thrombospondin-5 bekannt. Dabei handelt es sich um ein sekretiertes Glykoprotein, das über Disulfidbrücken ein Homopentamer bildet. COMP interagiert mit verschiedenen Knorpelmatrixproteinen und spielt somit eine wichtige Rolle im Matrixaufbau und der Matrixintegrität (Sophia Fox et al. 2009).

Die spezielle Zusammensetzung der Knorpel-EZM bestimmt maßgeblich seine biomechanischen Eigenschaften. Störungen der EZM können die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels beeinträchtigen.

1.2 Knorpelentstehung

Die Knorpelbildung ist eines der ersten morphogenetischen Ereignisse der Embryonalentwicklung. Als Stützgewebe besteht das embryonale Skelett dabei zunächst fast ausschließlich aus Knorpel, der über mineralisierten Knorpel als Übergangsform schließlich im Laufe der enchondralen Ossifikation durch Knochen ersetzt wird. Nach der Geburt befindet sich Knorpel zum einen noch als transienter Knorpel in den Wachstumsfugen nahe dem Ende der Röhrenknochen, die das Längenwachstum der Knochen bis zum Ende der Pubertät gewährleisten und sich danach schließen. Zum anderen befindet sich stabiler hyaliner Knorpel auf den Gelenkoberflächen, wo er einer reibungsarmen Bewegung der Knochen dient.

Die Knorpelentstehung durchläuft eine Reihe strikt regulierter Prozesse, die von der Kondensation mesenchymaler Chondroprogenitorzellen über die Differenzierung zu Chondrozyten zur Musterbildung chondrogenen Gewebes und skelettaler Strukturen verläuft (DeLise et al. 2000). Eine vereinfachte, schematische Übersicht der enchondralen Ossifikation ist in Abbildung 1 dargestellt.

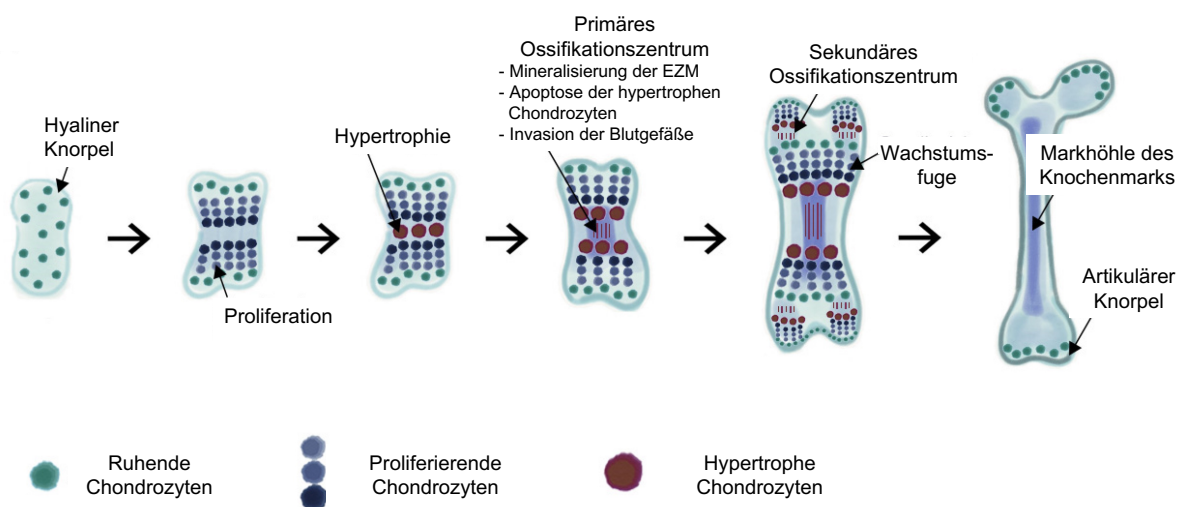


Abbildung 1. Knorpel- und Knochenbildung. Schematische Übersicht über die Schritte der enchondralen Ossifikation (modifiziert nach Rim et al. 2020).

Knorpel wird schrittweise durch die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen gebildet. Dabei kondensieren und proliferieren die Zellen zunächst (Fell 1925; Fell und Canti 1935; Searls et al. 1972; Thorogood und Hinchliffe 1975). Die Prächondrozyten im inneren Bereich der Zellkondensate beginnen den Mastertranskriptionsfaktor der Chondrogenese, *Sex Determining Region y-box 9* (SOX9) zu exprimieren, was die Produktion der Knorpelmatrixproteine Kollagen Typ II und Aggrekan stimuliert (Bi et al. 1999; Lefebvre und Smits 2005). Aus ihnen gehen Chondroblasten hervor, die proliferieren und weiter zu Chondrozyten differenzieren, die neben dem knorpelspezifischen Kollagen Typ II (Kosher et al. 1986; Kravis und Upholt 1985) und Aggrekan (Palmoski und Goetinck 1972) auch weitere EZM-Moleküle produzieren (Hale et al. 1988; Stirpe und Goetinck 1989; Swiderski und Solursh 1992). Eingebettet in ihre EZM bekommen die Chondrozyten eine charakteristische runde Morphologie. Im artikulären Knorpel wird diese frühere chondrale Entwicklungsstufe beibehalten und eine Weiterbildung in Richtung Knochen unterbleibt.

Der transiente Knorpel in den Wachstumsfugen hingegen schlägt anschließend eine enchondrale Entwicklung weiter zu hypertrophen Chondrozyten ein. Dabei reduzieren die Zellen die Expression von Kollagen Typ II und exprimieren Kollagen Typ X. Auch das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP, Gencode *ALPL*) wird angeschaltet, welches im Lauf der enchondralen Ossifikation anorganisches Pyrophosphat (PPi) zu Phosphat (Pi) hydrolysiert (Millan 2013; Rim et al. 2020). Kollagen Typ X bindet Kalzium, welches mit dem entstandenen Pi zu Hydroxyapatit reagiert und so das Gewebe mineralisiert. Die terminale Differenzierung von Chondrozyten erfolgt über die Transkriptionsfaktoren *Runt Related Transcription Factor 2* und *3* (*RUNX2/3*) und *Myocyte Enhancer Factor 2C* (*MEF2C*) (Arnold et al. 2007; Komori et al. 1997). Terminal differenzierte Chondrozyten sekretieren das Enzym Matrix Metalloproteinase 13 (*MMP13*), wodurch die gebildete EZM remodelliert wird (Cawston und Wilson 2006). Nicht eindeutig entschlüsselt ist, ob hypertrophe Chondrozyten die Apoptose einleiten und durch migrierende Osteoblasten ersetzt werden (Vortkamp et al. 1996) oder ob sie eine Transdifferenzierung zu Osteoblasten durchlaufen (Cancedda et al. 2000; Galotto et al. 1994).

1.3 Funktion von artikulärem Knorpel

Artikulärer Knorpel ist aufgrund der Gelenkbewegung einer Bandbreite an statischen und dynamischen mechanischen Belastungen mit Amplituden bis zu 10-20 MPa bei Aktivitäten wie dem Treppensteigen ausgesetzt. Der womöglich relevanteste physikalische Reiz im Knorpel ist Kompression. Sie resultiert aus dem Kontakt der Gelenkoberflächen bei der Bewegung. Verschiedene Studien konnten eine physiologische Spanne von $\leq 15-45$ % Kompression bestimmen (Armstrong et al. 1979; Grodzinsky et al. 2000; Herberhold et al. 1999; Notzli und Clark 1997). Die Kompression von Knorpel ruft auch weitere physikalische Reize hervor. Hydrostatischer Druck entsteht durch Kompression, wenn Flüssigkeit nicht entweichen kann. Durch eine hohe negative Ladungsdichte aufgrund der zahlreichen im Knorpel vorhandenen

sulfatierten Glykosaminoglykane werden freie Natriumionen im Knorpel gebunden und Wasser angezogen, so dass der Knorpel quillt. Durch Kompression findet eine Verdrängung des Wassers und der darin enthaltenen Natriumionen aus dem Knorpelgewebe statt, wodurch osmotischer Stress entsteht. Des Weiteren ist Knorpel Scherkräften ausgesetzt, die durch einen Strom der Synovialflüssigkeit um den Knorpel entstehen (Grodzinsky et al. 2000).

Physiologische mechanische Belastung von gesundem nativem Knorpel ist ein maßgeblicher Teil der Knorpelhomöostase. In verschiedenen Probandenstudien konnte gezeigt werden, dass physiologische mechanische Belastung essenziell für den Erhalt des artikulären Knorpels ist. Immobilisierungsstudien z.B. bei Hunden resultierten in einen Verlust von Proteoglykanen und einer dünneren Knorpelschicht (Palmoski und Brandt 1981; Palmoski et al. 1980). Bei gesunden Probanden zeigte sich ein schützender Effekt körperlicher Aktivität auf das Knorpelvolumen (Foley et al. 2007; Racunica et al. 2007) und hatte eine gesteigerte Synthese von Proteoglykanen zur Folge (Kiviranta et al. 1987; Parkkinen et al. 1993). Außerdem übte regelmäßige physiologische Bewegung einen regenerativen Effekt auf bereits geschädigten Knorpel von Probanden aus (Fransen et al. 2015; Roos und Dahlberg 2005). Somit ist physiologische mechanische Belastung ein wichtiger Faktor in der Knorpelhomöostase.

Die Funktion des artikulären Knorpels besteht darin, eine gleitende Gelenkbewegung zu ermöglichen und mechanische Kräfte zu absorbieren, ihnen standzuhalten und auf sie zu reagieren (Sanchez-Adams et al. 2014). Die Fähigkeit, mechanischen Kräften standzuhalten, wird allgemein als Mechanokompetenz bzw. mechanische Kompetenz des Knorpels bezeichnet (Eckstein et al. 2006; Gugjoo et al. 2016). Im weiteren Sinne umfasst die Mechanokompetenz des Knorpels mehr als seine rein physikalische Widerstandskraft gegenüber mechanischer Belastung und kann in drei wesentliche Aspekte aufgeteilt werden (Abbildung 2). Im Zuge der Mechanokopplung erfolgt eine Transmission der physikalischen Kräfte von der EZM zur Chondrozytenoberfläche, die vorwiegend von den physikalischen Eigenschaften der EZM abhängt. Im Zuge der Mechanotransduktion werden die physikalischen Kräfte durch Mechanorezeptoren auf der Chondrozytenoberfläche wie Integrinen oder Ionenkanälen wahrgenommen und von den Zellen in intrazelluläre Antworten übersetzt. Falls erforderlich lösen die Chondrozyten eine Mechanoadaptierung des Gewebes aus, die vorwiegend durch eine Remodellierung der Knorpel-EZM erfolgt. Auf diese Weise passt sich der Knorpel der neuen mechanischen Umgebung an (Gilbert und Blain 2018). Die Mechanokompetenz hängt also nicht nur vom ersten, rein physikalischen Aspekt ab, sondern auch von der Mechanotransduktion und der Mechanoadaptierung. Eine erweiterte Betrachtung der Mechanokompetenz inklusive Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung ist von großer Bedeutung, da degenerative Knorpelopathologien wie Arthrose mit Defiziten der zellulären und molekularen Reaktion auf Belastung einhergehen (Krishnan und Grodzinsky 2018). Wir haben bereits anhand von *in vitro* generiertem Knorpelersatzgewebe aus Chondrozyten wichtige Parameter der Mechano-

transduktion und Mechanoadaptation auf zellulärer und molekularer Ebene entschlüsselt (Hecht et al. 2019; Praxenthaler et al. 2018; Scholtes et al. 2018). Ein noch besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist jedoch weiterhin nötig, um geeignete Therapieoptionen zu entwickeln.

Daher soll die Mechanokompetenz in dieser Arbeit nicht nur als Widerstandskraft gegenüber mechanischen Belastungen im Zuge der Mechanokopplung, sondern auch inklusive der Aspekte Mechano-transduktion und Mechanoadaptation betrachtet werden. Um die Mechano-transduktion und Mechanoadaptation systematisch analysieren zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Mechanokopplung möglichst standardisiert wird. Im Folgenden wird näher auf die drei Aspekte der Mechanokompetenz eingegangen.

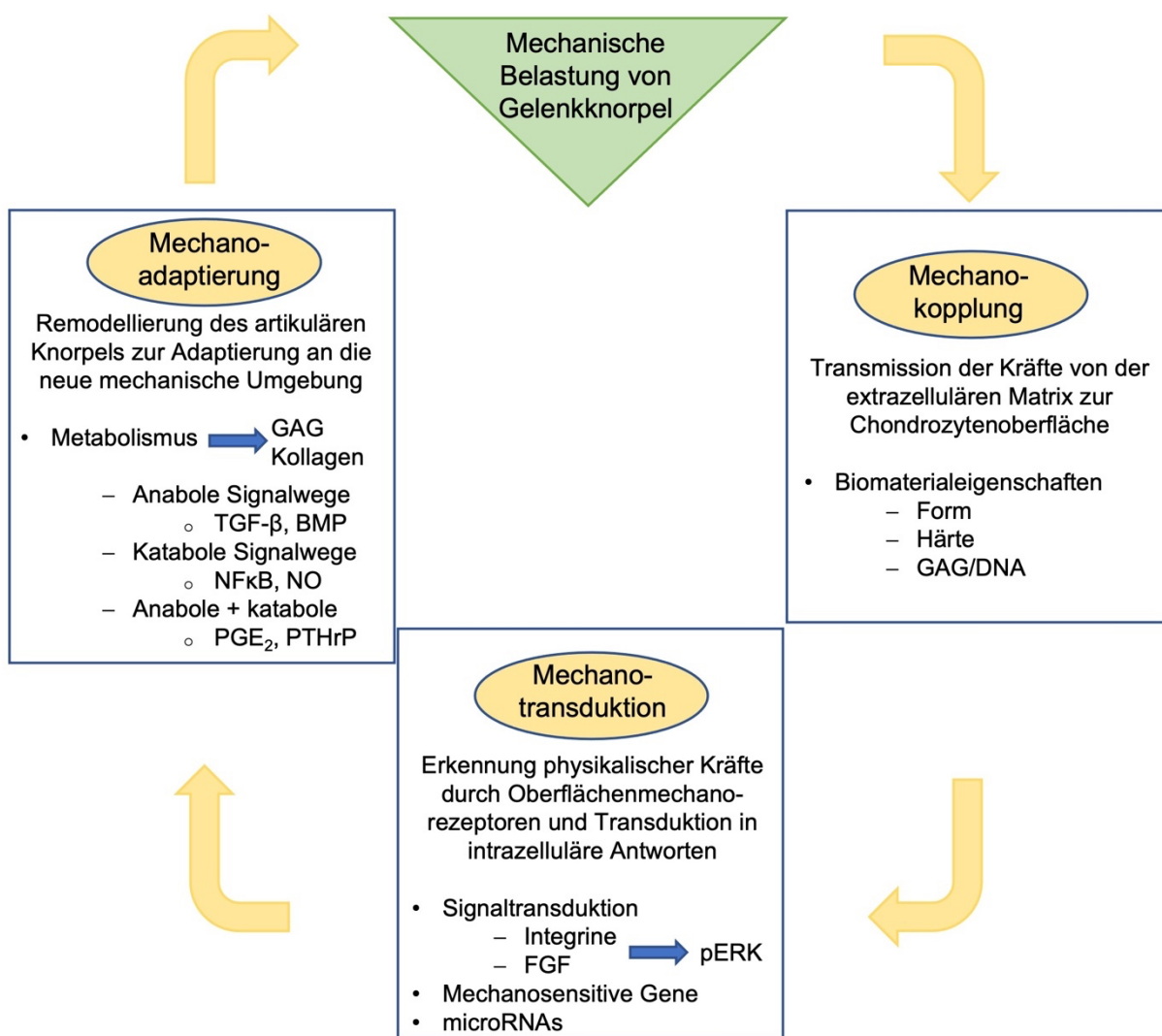


Abbildung 2. Mechanokompetenz von Gelenkknorpel. Schematische Darstellung der Wirkung mechanischer Belastung auf Knorpelgewebe. Dargestellt sind die drei Schritte der Mechanokompetenz: Mechanokopplung, Mechanotransduktion und Mechanoadaptation (modifiziert nach Gilbert und Blain 2018).

1.3.1 Mechanokopplung

Bei mechanischer Belastung des Knorpels werden die mechanischen Reize über die Knorpelmatrix zur Chondrozytenoberfläche weitergeleitet. Die Knorpelmatrix muss also nicht nur mechanischen Kräften standhalten, sondern auch eine adäquate Weiterleitung der Kräfte zu den Chondrozyten ermöglichen. Kompression, die auf die Knorpeloberfläche appliziert wird, führt zunächst zu einer Deformation der Knorpel-EZM, insbesondere auch der perizellulären Matrix in der unmittelbaren Chondrozytenumgebung. Es konnte gezeigt werden, dass Kompression auch zu einer Deformation der Chondrozyten selbst führt, was in einer Verformung der Zelle und des Nukleus resultiert. Dafür sind die Biomaterialeigenschaften der Knorpelmatrix, inklusive ihre Zusammensetzung und Integrität, von entscheidender Bedeutung (Grodzinsky et al. 2000). Der hohe Gehalt an Kollagenen dient dabei der Zugfestigkeit, während Proteoglykane die Druckstabilität gewährleisten. Somit sind die EZM-Zusammensetzung und der -gehalt, sowie die damit verbundene Härte und Steifigkeit des Knorpels wichtige Parameter für die Weiterleitung physikalischer Kräfte. Die Mechanokompetenz des Knorpels hinsichtlich der Mechanokopplung wird vorwiegend anhand der biomechanischen Eigenschaften des Knorpels bestimmt (Albarran-Juarez et al. 2018; Falcon et al. 2021; Kleemann et al. 2007; Shen et al. 2021; Stok et al. 2010). Dabei wird u.a. der Youngsche Modul, auch Elastizitätsmodul genannt, ermittelt, der den proportionalen Zusammenhang zwischen mechanischer Spannung und Dehnung bei der Verformung eines Festkörpers bei linear-elastischem Verhalten beschreibt. Er gibt somit Auskunft über die Steifigkeit des Knorpels. Eine alternative Messmethode zur Analyse der Knorpelhärte stellt die *Very Low Rubber Hardness* (VLRH) nach DIN ISO 48-3 (ersetzt DIN ISO 27588) dar. Diese Methode wurde ursprünglich zur Analyse weicher Materialien wie Silikon entwickelt. Dabei wird ein Kugelstempel mit einer Kontaktkraft von 8,3 mN für 5 s und einer nachfolgenden Testkraft von 100 mN für 30 s auf die Probe appliziert. Die Härte der Probe errechnet sich als VLRH-Einheiten aus der Eindringtiefe, die der Kugelstempel nach Ende der Testkraft erreicht. Bei einer anschließenden Entlastungsphase für 30 s werden zudem die Rückverformungseigenschaften der Probe aufgezeichnet (Strobel und Herrmann 2006).

Reduzierte man die Kollagenintegrität und den -gehalt von bovinen Knorpelimplantaten mit Kollagenase, so ging dies unter physiologischer dynamischer Kompression mit einer Reduktion des Youngschen Moduls einher und führte zu unzureichenden Biomaterialeigenschaften und somit zu einer unzureichenden Mechanokompetenz auf Gewebeebene (Park et al. 2008). Durch minderwertige biomechanische Eigenschaften kann der Knorpel mechanischer Belastung nicht ausreichend standhalten und kann einen Verlust von Knorpelmatrixmolekülen durch die Belastung nicht ausgleichen, was langfristig zu einem Verlust der Knorpelintegrität und der Gelenkfunktion führen kann. Dies geht mit erheblichen Einschränkungen der Beweglichkeit und häufig mit Schmerzen einher und fördert degenerative Erkrankungen (Hunter und Bierma-Zeinstra 2019). Ist die Mechanokopplung im Knorpel gewährleistet, werden mechanische

Reize zu den Chondrozyten weitergeleitet, woraufhin die Mechanotransduktion stattfinden kann.

1.3.2 Mechanotransduktion

1.3.2.1 Integrine

Im Zuge der Mechanotransduktion werden mechanische Reize zunächst über mechanosensitive Rezeptoren von den Zellen wahrgenommen (Gilbert und Blain 2018). Eine wichtige Gruppe mechanosensitiver Rezeptoren sind Integrine. Ihre Rolle als Mechanorezeptoren wurde bereits 1991 in einem Meinungsartikel von Donald Ingber vorgeschlagen (Ingber 1991) und von Wang et al. an Endothelzellen unter der Verwendung von Scherkräften belegt (Wang et al. 1993). Anhand von zyklischer Dehnung von humanen Chondrozyten (Wright et al. 1997) und dynamischer Kompression von bovinen Knorpelplantaten (Lucchinetti et al. 2004) wurde die Mechanosensitivität der Integrine auch im Knorpelkontext bestätigt. Sie sind heterodimere Transmembranproteine, die die EZM mit dem Zytoskelett der Zellen verbinden. Die 24 bekannten Heterodimere bestehen aus Kombinationen von 18 Typ α und acht Typ β Untereinheiten und können in fibronektinbindende ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$) und kollagenbindende ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$) Heterodimere unterteilt werden (Loeser 2014). Aufgrund ihrer Funktion wird das Integrinexpressionsprofil der Zellumgebung angepasst (*Inside-Out Signaling*) (Legate et al. 2009) und durch Wachstumsfaktoren und weitere externe Stimuli wie mechanische Reize moduliert. Die integrinvermittelte Signaltransduktion wird hauptsächlich durch die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) übermittelt, die *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalwege wie *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK)1/2 und p38 aktiviert (Loeser 2014; Wright et al. 1997).

1.3.2.2 MAPK-Signalwege

Nachdem mechanische Reize von den Zellen über ihre mechanosensitiven Rezeptoren wahrgenommen wurden, erfolgt die Transduktion der physikalischen Reize in chemische Signale durch die intrazelluläre Aktivierung von Signalkaskaden. Die MAPK-Signalwege gehören zu den prominentesten Mechanotransduktionswegen (Iqbal und Zaidi 2005; Jalali et al. 1998; MacKenna et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Takahashi und Berk 1996; Yamazaki et al. 1995). Externe Signale werden dabei über eine Phosphorylierungskaskade durch mehrere MAPK transduziert, bis sie schließlich ERK1/2, p38 oder *c-Jun N-Terminal Kinase* (JNK) phosphorylieren.

Die Mechanosensitivität von ERK1/2 im Knorpel wurde erstmals von Fanning et al. in bovinen Knorpelplantaten nach statischer Kompression beschrieben (Fanning et al. 2001). Weitere

Studien konnten zeigen, dass statische (Fanning et al. 2003) oder dynamische (Fitzgerald et al. 2008) Kompression die Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und der JNK Kinase 1 (SEK1) kompressionsgrößen-abhängig stimulierte. In Studien von Vincent et al. wurde die durch zyklische Kompression (2 min) induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in porcinen Chondrozyten und Knorpelimplantaten mit *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-2 in Verbindung gebracht, welches an Perlecan in der perizellulären Matrix gebunden vorliegt und durch die Belastung freigesetzt werden soll (Vincent et al. 2004; Vincent et al. 2007). Da der ERK1/2-Signalweg mit der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse einschließlich Proliferation, Dedifferenzierung (Yoon et al. 2002), Apoptose (Shakibaei et al. 2001) und der Biosynthese von Matrixmolekülen (Hung et al. 2000; Watanabe et al. 2001) assoziiert ist, wird er als einer der relevantesten Mechanotransduktionswege angesehen. Eine Phosphorylierung von ERK1/2 nach mechanischer Belastung kann somit als Indikator dafür dienen, dass eine Mechanotransduktion erfolgte.

1.3.2.3 Mechanosensitive Gene

Als nächster wichtiger Schritt im Laufe der Mechanotransduktion erfolgt eine Regulation der Expression mechanosensitiver Gene. Als ein *Immediate early gene*, dessen Expression bereits unmittelbar nach erfolgter Belastung stimuliert ist, wurde das ERK1/2-assoziierte *v-fos* *FBJ Murine OsteoSarcoma Viral Oncogene Homolog* (*c-Fos*, human: *FOS*) anhand von Rattenherzmuskelzellen unter Zugbelastung beschrieben (Komuro et al. 1990; Komuro et al. 1991). Im Knorpel wurde die Mechanosensitivität von *c-Fos* nach dynamischer Scher- und Kompressionsbelastung von bovinen Knorpelimplantaten in Studien von Fitzgerald et al. bestätigt (Fitzgerald et al. 2008; Fitzgerald et al. 2004; Fitzgerald et al. 2006).

Fitzgerald et al. zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression des bekannten mechanosensitiven Gens Cyclooxygenase 2 (*Cox2*), auch bekannt als Prostaglandinsynthase 2 (*Ptgs2*, *Pghs2*) (Fitzgerald et al. 2008; Fitzgerald et al. 2004; Fitzgerald et al. 2006). Auch in einer Kompressionsstudie mit murinen Knorpelimplantaten wurde eine belastungsinduzierte Stimulation der *Cox2*-Expression beobachtet (Gosset et al. 2006). Bereits 1997 wurde in murinen Osteoblasten unter zyklischer Flüssigkeitsscherbelastung eine Stimulation der *Cox2*-Expression beobachtet (Klein-Nulend et al. 1997), die in einer Folgestudie mit humanen Osteoblasten bestätigt werden konnte (Joldersma et al. 2000).

Die Expression von Mitgliedern der *Nuclear Receptor 4A* (NR4A)-Rezeptorfamilie kann durch vielfältige Reize und Stimulanzen induziert werden, u.a. durch mechanische Belastung (Pearen und Muscat 2010). So wurde eine Stimulation der Expression von *NR4A2*, auch bekannt als *NURR1*, in leukämischen Zelllinien unter Flüssigkeitsscherbelastung festgestellt (Bandoh et al. 1997). Auch in skelettalen Muskelbiopsien von jungen, männlichen Probanden nach 75 min exzessiver körperlicher Aktivität wurde eine erhöhte Genexpression von *NR4A2*

beobachtet (Mahoney et al. 2005). Für nativen Knorpel gibt es bis dato keine Berichte, dass *NR4A2* durch Belastung induziert ist, jedoch wurde die Mechanosensitivität von *NR4A2* von unserer Arbeitsgruppe anhand einer *in vitro* Studie mit humanem Knorpelersatzgewebe beobachtet. Auch die Mechanosensitivität des mit dem WNT-Signalweg assoziierten Gens *Axin1 Up-Regulated 1 (AXUD1)* und des ERK-assoziierten Gens *Dual Specificity Phosphatase 5 (DUSP5)* wurde bislang nur für unser Knorpelersatzgewebe beschrieben (Scholtes et al. 2018).

Für die mechanosensitive Expression von Liganden des *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*-Signalwegs, wie *BMP2* oder *BMP6*, sind kontroverse Berichte in der Literatur zu finden. Bereits 1999 wurde in Knochenfragmenten von Ratten in einem *in vivo* Experiment, in dem die Ratten einer graduellen Distraction ab Tag 7 für 21 Tage (0,25 mm/12 h) nach Femur-Osteotomie ausgesetzt waren, beobachtet, dass die Expression von *Bmp2*, nicht aber *Bmp6*, durch den mechanischen Stress induziert war (Sato et al. 1999). Eine erhöhte Expression von *BMP2* und *BMP6* wurde anhand von zyklischer Dehnung (12 %, 0,07 Hz, 24 h) von humanen Desmodontzellen (Wescott et al. 2007) beobachtet und für *BMP2* mit einem anderen zyklischen Dehnungsprotokoll (3-10 %, 0,02 Hz, 6 h) bestätigt, was als Folge einer belastungsinduzierten Aktivierung des COX2-Signalwegs interpretiert wurde (Suzuki et al. 2014). In der murinen Osteoblastenlinie MC3T3-E1 unter zyklischer Dehnung (1 %, 1 Hz, 1 h mit Wiederholung nach 1 h Pause) wurde eine mechanostimulierte Expression von *Bmp2* und *Bmp6* berichtet (Siddhivarn et al. 2007). Eine *in vivo* Studie mit einem Knochenheilungsmodell bei Ratten berichtete keine Regulation von *Bmp2*, aber eine Reduktion der *Bmp6*-Expression nach Anwendung einer zyklischen Dehnungsbelastung (+35°/-25°, 1 Hz, 15 min/Tag, 5 Tage/Woche) ab Tag 10 nach erfolgter Operation für 1-4 Wochen (Palomares et al. 2009). Eine kompressionsinduzierte Expression von *BMP2* und *BMP6* wurde erstmals für humane Chondrozyten von unserer Arbeitsgruppe in Knorpelersatzgewebe gezeigt (Scholtes et al. 2018).

Eine mechanosensitive Expression des wichtigen chondrogenen Transkriptionsfaktors *Sox9* konnte nach zyklischer Dehnung *in vitro* (12 %, 0,07 Hz, 24 h) von humanen Desmodontzellen (Wescott et al. 2007) und von zyklischer Dehnung (6 %, 0,25 Hz, 90 min pro Tag, 3 Tage) von Rattenchondrozyten (Perera et al. 2010), sowie in Vorläuferzellen aus Hühnerextremitätsknospen unter hydrostatischem Druck (600 Pa, 0,05 Hz, 30 min) (Juhasz et al. 2014) beobachtet werden. In dynamischen Scher- und Kompressionsstudien mit bovinen Knorpelimplantaten wurde jedoch keine belastungsinduzierte *Sox9*-Expression berichtet (Fitzgerald et al. 2008; Fitzgerald et al. 2006), was andeutet, dass die Expression von *Sox9* anscheinend nur unter bestimmten Bedingungen durch mechanische Belastung induziert wird.

Um eine Mechanotransduktion zu charakterisieren, kann somit die belastungsinduzierte Stimulation mechanosensitiver Gene herangezogen werden.

1.3.2.4 Micro-RNAs

Auch epigenetische Regulationsmechanismen können durch mechanische Belastung stimuliert werden. Dazu gehört u.a. die Regulation der Expression von microRibonukleinsäuren (microRNAs, miRs). Dabei handelt es sich um nicht-codierende einzelsträngige RNA Moleküle. Sie haben eine Länge von ca. 19-25 Nukleotiden und binden an spezifische Sequenzen in der Ziel-RNA, wodurch sie die Expression des Zielgens posttranskriptional inhibieren können. Dies geschieht entweder durch Abbau der Ziel-DNA oder durch Inhibition der Translation (Bartel 2004). Im Knorpel wurde eine erhöhte Expression von miR-365 nach mechanischer Belastung von Hühnerchondrozyten gezeigt (Guan et al. 2011). Eine erhöhte Expression von miR-221/-222 in gewichtstragenden Bereichen boviner Kondylen deutete eine mögliche Regulation durch Belastung an, jedoch konnte keine direkte belastungsinduzierte Regulation von miR-221/-222 bestätigt werden (Dunn et al. 2009). Eine robuste Mechanoinduzierbarkeit von miR-221 wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe anhand von dynamischer Kompression von Knorpelersatzgewebe bewiesen und eine Mechanosensitivität von miR-6872-3p und miR-6723-5p identifiziert (Hecht et al. 2019).

Somit können auch epigenetische Regulationsmechanismen, wie eine Induktion mechanosensitiver miRs, die Mechanotransduktion charakterisieren.

1.3.3 Mechanoadaptierung

Nach Transduktion mechanischer Reize ins Zellinnere integrieren die Chondrozyten alle erhaltenen Signale und leiten, falls erforderlich, unter Anpassung ihres Stoffwechsels Veränderungen ein, um den artikulären Knorpel durch Remodellierung an eine neue mechanische Umgebung anzupassen. Ziel ist dabei das physiologische Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus auf die Gegebenheiten einzustellen (Gilbert und Blain 2018). Zum Erhalt der Knorpelhomöostase und um einen Verlust von EZM-Molekülen durch mechanische Belastung zu kompensieren, synthetisieren Chondrozyten zum Beispiel neue EZM-Moleküle wie Proteoglykane und Kollagene (Grodzinsky et al. 2000). So konnte eine Studie an Hundeknorpelimplantaten zeigen, dass eine moderate Belastung von intermittierender Kompression (550 mN/mm², 4 s gefolgt von 11 s Pause, 2 h) die GAG-Synthese um 34 % steigern konnte, während eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Steigerung der Kollagensynthese um 10 % beobachtet wurde (Palmoski und Brandt 1984). Eine Studie von Sah et al. mit bovinen Knorpelimplantaten zeigte, dass eine 23-stündige dynamische Kompressionsepisode von 1,1-4,5 % bei 0,01 Hz die Kollagensynthese um 40 % und die GAG-Synthese um 30 % steigern konnte. Eine erhöhte Frequenz von 0,1-1 Hz und geringere Kompression von 0,7 % resultierte ebenfalls in einer Stimulation der Kollagen- und GAG-Synthese um 20-40 % (Sah et al. 1989). Eine Stimulation der GAG- und Kollagensynthese durch physiologische zyklische Kompression wurde in weiteren Studien mit mandibulären Knorpelimplantaten von Ratten (Coprpy et

al. 1985) und bovinen Knorpelimplantaten (Kim et al. 1994; Korver et al. 1992; Larsson et al. 1991; Parkkinen et al. 1992) bestätigt. Die Anpassung der EZM-Synthese ist somit ein wesentlicher Teil der Mechanoadaptierung im Knorpel. Sie kann durch verschiedene anabole und katabole Signalwege reguliert werden, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.3.3.1 Anabole Signalwege

TGF- β - und BMP-Signalweg

Zu den anabolen Signalwegen der EZM-Synthese zählen die Signalwege der *Transforming Growth Factor* (TGF)- β -Superfamilie, wobei TGF- β selbst von besonderer Bedeutung in der Belastungsantwort ist. Die TGF- β Superfamilie umfasst mehr als 30 Faktoren, einschließlich TGF- β 1-3, Aktivine, BMPs und *Growth/Differentiation Factors* (GDFs). TGF- β 1-3 werden als inaktive Homo- oder Heterodimere vom *Latency-Associated Peptide* (LAP) und *Latent TGF-beta Binding Protein* (LTBP) gebunden. Etwa 200 ng/mL inaktives TGF- β befindet sich gebunden an die EZM in der Oberflächzone des Knorpels (Albro et al. 2013). Die Synovialflüssigkeit enthält ca. 10-40 % latentes TGF- β (Fava et al. 1989). Durch mechanische Belastung in Form von Scherkräften durch die Gelenkbewegung wird inaktives TGF- β aus der Synovialflüssigkeit aktiviert (Albro et al. 2012). Eine Aktivierung von TGF- β erfordert eine Trennung von LAP, was durch enzymatischen Abbau von LAP oder durch konformationelle Änderungen der Tertiärstruktur von LAP erfolgen kann. Neben Scherkräften stellen auch weitere mechanische Kräfte wie Kompression einen wichtigen physiologischen Aktivator des EZM-gebundenen TGF- β dar.

Die Faktoren der TGF- β Superfamilie sind durch eine gemeinsame Dimerstruktur charakterisiert. TGF- β hat neun konservierte Cysteinseitenketten, von denen acht miteinander Disulfidbrücken ausbilden und einen für die TGF- β Superfamilie charakteristischen Cysteinknoten bilden. Der neunte Cysteinrest bildet eine Disulfidbrücke mit dem neunten Cysteinrest eines weiteren TGF- β -Moleküls aus, wodurch die Dimerstruktur entsteht (Daopin et al. 1992). Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt über die Bildung von heteromeren Komplexen zwischen zwei Typen (Typ I und II) von Serin/Threonin-Proteinkinase-Rezeptoren. Es gibt sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren (Thielen et al. 2019). Im kanonischen Signalweg bindet TGF- β an den TGF- β -Rezeptor II (TGFBR)II, der mit dem TGFBR I, auch bekannt als *Activin Receptor-Like Kinase* (ALK)5, einen Heterodimer bildet, wodurch die Proteine *SMAD and Mothers Against Decapentaplegic* (SMAD)2 und SMAD3 phosphoryliert werden und SMAD4 binden. Dieser Komplex transloziert in den Nukleus, bindet das *SMAD Binding Element* (SBE) und induziert als Transkriptionsfaktor die Expression chondrogener Marker. Zusätzlich zeigt der TGF- β -Rezeptor eine gewisse Promiskuität, da TGF- β auch SMAD1/5/9 aktivieren kann, welches dem kanonischen BMP-Signalweg zugeordnet wird (Thielen et al. 2019; Wu et al. 2016).

Die BMP Liganden dagegen binden den BMP-Rezeptor I (ALK3), der mit BMPRII, ALK2 oder ALK6 heterodimerisiert, wodurch SMAD1, 5 und 9 phosphoryliert werden. Diese bilden einen Komplex mit SMAD4 und binden im Nukleus das *SBE BMP Responsive Element* (BRE), wodurch die Expression von Molekülen der Knorpelmatrix induziert wird (Blaney Davidson et al. 2009).

Der TGF- β - und der BMP-Signalweg sind von großer Bedeutung für die Knorpelmatrixsynthese, da sie den Mastertranskriptionsfaktor für die Expression von Kollagen Typ II und Aggrekan, SOX9, aktivieren (Dexheimer et al. 2016; Healy et al. 1999; Hellingman et al. 2011; Thielen et al. 2019). So könnten der TGF- β - und der BMP-Signalweg die Mechanoadaptierung in Chondrozyten positiv beeinflussen.

1.3.3.2 Katabole Signalwege

Wichtige katabole, mechanosensitive Signale, die bei der Analyse der Mechanoadaptierung in Betracht gezogen werden sollten, sind der *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells* (NF κ B)-Signalweg und Stickstoffmonoxid (NO), die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

NF κ B-Signalweg

Der NF κ B-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Belastungsantwort. Er wird durch mechanische Reize (Choi et al. 2019; Marcu et al. 2010), aber auch durch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β und *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α aktiviert (Knobloch et al. 2008; Lotz 2001). Eine Studie mit bovinen Endothelzellen berichtete die Bildung von NF κ B-DNA-Komplexen nach Flüssigkeitsscherbelastung (Lan et al. 1994). Eine nukleare Translokation und DNA-Bindung des NF κ B-Transkriptionsfaktors p65 wurde in Studien mit humanen Endothelzellen unter zyklischer Dehnung (10 %, 1 Hz, 24 h) (Du et al. 1995) oder unter gestörter laminarer Flüssigkeitsscherbelastung (Nagel et al. 1999), sowie mit koronaren glatten Muskelzellen unter zyklischer Dehnung (6-25 %, 1 Hz, 24 h) (Hishikawa et al. 1997) beobachtet. In Femurexplantaten von Ratten resultierte eine Kompression von 10-30 % in einer nuklearen Translokation von p65 (Nam et al. 2009) und humane Chondrozyten reagierten mit einer gesteigerten Phosphorylierung von p65 unter Scherbelastung (Wang et al. 2010). In Kaninchenchondrozyten führte zyklische Dehnung von 6 % bei 0,05 Hz für 15-90 min zu einer Inhibition der durch IL-1 β induzierten nuklearen Translokation von p65, sowie der p65 Genexpression nach zyklischer Dehnung für 30-180 min. Zyklische Dehnung einer höheren Belastungsgröße von 15 % löste diesen antagonistischen Effekt nicht aus und resultierte in einer nuklearen Translokation von p65 nach 30-180 min (Agarwal et al. 2004). Die Berichte in der Literatur weisen somit darauf hin, dass der NF κ B-Signalweg je nach Belastung und Begleitumständen aktiviert oder inhibiert wird (Knobloch et al. 2008; Marcu et al. 2010).

NFκB-Aktivierung wird auch mit negativen Effekten auf die EZM-Produktion assoziiert (Marcu et al. 2010). So wurde gezeigt, dass eine Behandlung von humanen Chondrozyten in Monolayerkultur mit IL-1β in einer Reduktion des GAG- und Kollagengehalts resultierte (Bassleer et al. 1998). Auch eine Stimulation des NFκB-Signalwegs mit TNF-α führte in Rattenchondrozyten zu einer reduzierten *Col2a1*-Expression (Seguin und Bernier 2003). Des Weiteren wurde berichtet, dass NFκB den bedeutenden differenzierungsrelevanten Transkriptionsfaktor SOX9 inhibieren kann, was in einer Reduktion wichtiger chondrogener Marker resultierte (Murakami et al. 2000; Sitcheran et al. 2003). Demnach kann eine Aktivierung des NFκB-Signalwegs anti-chondrogene Wirkungen zur Folge haben, die sich auf die EZM-Synthese auswirken könnten. Unter Belastung korrelierte die NFκB-Aktivität ebenfalls mit anti-chondrogenen Effekten. In Chondrozyten, die hohen zyklischen Dehnungsbelastungen zwischen 25-50 % ausgesetzt waren, wurde parallel zu einer nuklearen Translokation von NFκB auch eine stimulierte Expression pro-inflammatorischer Aktivatoren wie COX2, TNF-α und IL-1β beobachtet. Interessanterweise ging die belastungsinduzierte NFκB-Aktivierung mit einer Reduktion der Expression von *ACAN* und *COL2A1* einher (Anghelina et al. 2008). In Chondrozyten führte zyklische Dehnung von 10-15 % zu einer nuklearen Translokation von p65/p50, was mit einer Inhibition der Proteoglykanproduktion einherging. Interessanterweise wurde in der gleichen Studie berichtet, dass eine geringere zyklische Dehnung von 3-8 % eine IL-1β-induzierte nukleare Translokation von p65/p50 inhibieren kann, was von einer erhöhten Produktion von Matrixmolekülen begleitet war (Deschner et al. 2003). Somit könnte der NFκB-Signalweg die EZM-Synthese im Zuge der Mechanoadaptierung im Knorpel je nach Inflammationsstatus unterschiedlich beeinflussen.

Die NFκB-Transkriptionsfaktoren bilden Homo- oder Heterodimere in 15 verschiedenen Kombinationen bestehend aus den fünf Proteinen p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/NFκB1 bzw. p105 als inaktive Vorstufe von p50 und p52/NFκB2 bzw. p100 als inaktive Vorstufe von p52 aus. Durch ihre gemeinsame N-terminale Domäne mit Rel-Homologie können sie mit inhibitorischen Proteinen interagieren, zu aktiven Komplexen dimerisieren und in den Nukleus translokieren. Strukturell besitzen p65, RelB und c-Rel eine Transaktivierungsdomäne, so dass Homo- und Heterodimerkombinationen zwischen p50 und p52 nicht als Transkriptionsaktivatoren agieren können. In inaktiver Form liegen die Dimere komplexiert mit inhibitorischen Molekülen (*Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor* (IκB)α, IκBβ, IκBε) im Cytoplasma vor. Durch Stimulation des NFκB-Signalwegs werden die IκB-Moleküle durch IκB-Kinasen (IKKB) phosphoryliert, woraufhin sie ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden. Die NFκB-Dimere translokieren anschließend in den Nukleus, wo sie an die Promotorregionen von Zytokinen, MMPs, COX2 und *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) binden und somit deren Transkription aktivieren können (Choi et al. 2019; Marcu et al. 2010; Mariani et al. 2014; Newton et al. 1997). Ein gängiger NFκB-Inhibitor ist Bay11-7082. Er inhibiert die Phosphorylierung von IκBα und somit die Dissoziation des inhibitorischen Komplexes,

so dass eine nukleare Translokation von NFκB verhindert wird (Lee et al. 2012). Bay11-7082 kann also dazu dienen, die Rolle des NFκB-Signalwegs in der mechanischen Belastungsantwort zu entschlüsseln.

Demzufolge stellt der NFκB-Signalweg einen wichtigen mechanosensitiven Signalweg dar, der die Produktion von Knorpelmatrixmolekülen inhibieren kann, und somit die Mechanoadaptation im Knorpel beeinflussen könnte.

NO-Signal

Ein weiteres wichtiges kataboles mechanosensitives aktives Molekül im Knorpel ist Stickstoffmonoxid (NO). NO kann durch mechanische Reize induziert werden (Guilak et al. 2004). Bereits 1997 konnte eine Studie von Das et al. an bovinen Chondrozyten unter Flüssigkeitsscherbelastung zeigen, dass eine steigende Belastungsdauer und -größe in einer steigenden NO-Freisetzung resultierte (Das et al. 1997). Kaninchenchondrozyten unter steigender zyklischer Dehnungsbelastung (12-18 %, 0,05 Hz) reagierten ebenfalls mit einer steigenden NO-Freisetzung, während eine geringe Belastung von 4-8 % keinen Effekt auf die NO-Freisetzung hatte. Passend dazu wurde eine Induktion der Genexpression des NO-produzierenden Enzyms (*iNOS*) bei Dehnungsbelastungen von 10-18 % beobachtet (Agarwal et al. 2004). Auch in Kompressionsstudien mit porcinen (Fermor et al. 2005; Fermor et al. 2001) und murinen (Gosset et al. 2006) Knorpelimplantaten konnte eine Stimulation der NO-Produktion beobachtet werden. In humanen Chondrozyten wurde eine NO-Stimulation durch Scherbelastung beobachtet (Lee et al. 2003). Demzufolge kann die NO-Produktion durch mechanische Belastung aktiviert werden.

Eine NO-Aktivierung ist überwiegend auch mit inhibierenden Effekten auf die EZM-Synthese assoziiert. Mittels Knorpelimplantaten von Kaninchen wurde gezeigt, dass NO eine Reduktion der Proteoglykansynthese vermitteln kann (Taskiran et al. 1994). Humane Chondrozyten aus Arthroseknorpel, die kontinuierlichem hydrostatischem Druck von 24 MPa für 3 h ausgesetzt wurden, reagierten mit einer Steigerung der NO-Produktion und einem simultanen Verlust von Proteoglykanen, während zyklischer hydrostatischer Druck geringer Belastungsgröße (1-5 MPa, 0,25 Hz, 3 h) die NO-Produktion nicht signifikant beeinflusste, jedoch in einer Steigerung des GAG-Gehalts resultierte (Fioravanti et al. 2010). Eine Studie mit bovinen Chondrozyten unter Flüssigkeitsscherbelastung zeigte jedoch eine simultane Stimulation der NO-Produktion und der GAG-Synthese (Das et al. 1997). Somit ist nicht eindeutig geklärt, wie eine belastungsinduzierte NO-Produktion die GAG-Synthese in Chondrozyten beeinflusst. Dennoch sollte NO als wichtiges mechanosensitives Molekül in Belastungsstudien analysiert werden.

Unter Belastung werden NO und Citrullin aus L-Arginin über das Zwischenprodukt Anhydroxyarginin produziert. Diese Reaktion wird von einer von drei Isoformen der *Nitric Oxide Synthase* (NOS) katalysiert. In der Knorpeldegeneration ist die Expression von *iNOS* erhöht und

die damit verbundene erhöhte Produktion von NO kann zu einer Stimulation pro-inflammatorischer Zytokine und kataboler Prozesse durch Aktivierung von MMPs und des NFκB-Signalwegs führen (Abramson 2008; Guilak et al. 2004). Somit ist NO ein bedeutendes mechanosensitives Molekül und könnte die EZM-Synthese in Chondrozyten beeinträchtigen, was negative Folgen für die Mechanoadaptation haben könnte.

1.3.3.3 Signalwege mit anaboler und kataboler Wirkung

COX2/Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Signale

Mechanosensitive Signalmoleküle, denen sowohl anabole als auch katabole Effekte zugesprochen werden, sind COX2 und PGE₂. Eine Studie mit porcinen Knorpel-explantaten konnte eine PGE₂-Freisetzung bei Kompressionsstärken zwischen 0,025 und 0,05 MPa nach 24-stündiger dynamischer Kompression mit einer Frequenz bei 0,5 Hz nachweisen (Fermor et al. 2005). Eine Mechanosensitivität von COX2 und PGE₂ im Knorpel wurde auch mit murinen Knorpel-explantaten nach dynamischer Kompression (1 MPa, 0,5 Hz) für 2-18 h beobachtet (Gosset et al. 2006).

In der Literatur sind mehrere Studien zu finden, die den PGE₂-Signalweg mit einer Hemmung der GAG-Synthese assoziieren. So zeigte eine Studie von Attur et al. mit humanen Arthroseknorpel-explantaten, dass eine Behandlung mit 1 µM exogenem PGE₂ für 6 Tage eine signifikante Reduktion der GAG-Synthese verursachte (Attur et al. 2008). In Co-Kulturen von humanem Arthroseknorpel mit Synovialmembranen führte eine Inhibition von COX2 zu einer reduzierten GAG-Freisetzung (Hardy et al. 2002). Andere Studien berichteten einen anabolen Effekt von PGE₂. So beobachteten DiBattista et al., dass PGE₂ bei humanen AC in Monolayerkultur die Kollagensynthese stimulieren kann (Di Battista et al. 1996). Eine Studie mit einer Rattenchondrozytenlinie beobachtete eine Steigerung der GAG-Synthese mit steigender exogener PGE₂-Konzentration (1-10 µM) (Lowe et al. 1996). Eine Steigerung der GAG-Ablagerung und der *Col2a1*-Genexpression nach Behandlung mit 1-10 µM PGE₂ wurde in einer Studie mit Rattenchondrozyten in Monolayerkultur gezeigt (Miyamoto et al. 2003). Eine Studie, die die Auswirkungen mechanischer Belastung anhand von Flüssigkeitsscherbelastung auf den Metabolismus boviner und humaner Chondrozyten untersuchte, zeigte eine belastungsinduzierte PGE₂-Freisetzung und eine simultane Stimulation der GAG-Synthese (Smith et al. 1995). Demnach kann COX2/PGE₂ je nach Versuchsaufbau die EZM-Synthese in Chondrozyten stimulieren oder reduzieren und könnte so die Mechanoadaptation in Chondrozyten beeinflussen.

PGE₂ ist ein wichtiges Schlüsselmolekül in der Entzündungs- und Schmerzvermittlung. Es wird konstitutiv durch die Aktivität von COX1 produziert. Durch mechanische Reize oder pro-inflammatorische Zytokine wird die Expression von COX2 induziert, was zu einer erhöhten PGE₂ Produktion führt (Guilak et al. 2004; Park et al. 2006). PGE₂ wird über zwei Schritte produziert.

Zunächst wird Arachidonsäure mithilfe des Enzyms COX2 zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) katalysiert, welches mittels PGE-Synthasen (PGES) zu PGE₂ umgesetzt wird. PGE₂ bindet anschließend einen von vier G-Protein-gekoppelten Prostaglandin E-Rezeptoren (EP1-4), wodurch abhängig vom gebundenen Rezeptor unterschiedliche nachgeordnete Signalkaskaden aktiviert werden. So wird durch Bindung von PGE₂ an EP2 vorwiegend der cycloAMP (cAMP)/Proteinkinase A (PKA)-Signalweg aktiviert, während eine Bindung an EP4 neben dem cAMP/PKA-Signalweg auch den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)-Signalweg stimulieren kann und eine Bindung von PGE₂ an EP1 in einer Stimulation des Kalziumsignalwegs resultiert. Nicht-kanonisch kann PGE₂ über EP2 und EP4 auch MAPK-Signalwege induzieren (Haversath et al. 2012).

Somit ist der PGE₂-Signalweg ein bedeutender mechanosensitiver Signalweg in Chondrozyten, der die EZM-Synthese positiv oder negativ beeinflussen könnte und so einen Beitrag zur Mechanoadaptation leisten könnte.

Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP)/cAMP/PKA-Signalweg

Ein weiterer mechanosensitiver Signalweg, dem sowohl anabole als auch katabole Effekte zugesprochen werden, ist der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Expression von PTHrP (Genname *PTH LH*) durch mechanische Belastung induziert werden kann. So wurde eine Stimulation der *Pthlh*-Expression durch zyklische Dehnung von Chondrozyten in Monolayerkultur der Spezies Ratte von Tanaka et al. (7-12 %, 0,5 Hz, 12 h) beobachtet (Tanaka et al. 2005) und von weiteren Studien bestätigt (Xu et al. 2013). Auch mit bovinen Chondrozyten konnte eine Induktion der *Pthlh*-Expression durch zyklische Dehnung gezeigt werden (16 %, 0,5 Hz, 12-48 h) (Wang et al. 2011). Nach statischem Druck von 100 kPa für 1-4 h wurde ebenfalls eine Induktion von *Pthlh* in mandibulären Chondrozyten von Kaninchen berichtet (Huang et al. 2015). Jedoch zeigten Rattenchondrozyten unter zyklischer Dehnung (10 %, 1 Hz, 24 h) keine Induktion von *Pthlh* (Chu et al. 2017), während humane Chondrozyten bei sechsständiger zyklischer Dehnung (0,5 Hz) bei 2000 μ strain mit einer Stimulation und bei 4000 μ strain mit einer Reduktion von *PTH LH* reagierten (Sun et al. 2017). In *in vivo* Studien wurde eine Induktion von *Pthlh* in mandibulärem Knorpel nach erzwungener Mundöffnung bei Mäusen (Sobue et al. 2011) oder seitlicher Verschiebung des Unterkiefers bei Ratten (Ng et al. 2006; Yang et al. 2020) beobachtet. Des Weiteren ist eine Mechanoinduzierbarkeit des nachgeschalteten cAMP/PKA-Signalwegs bekannt (Iqbal und Zaidi 2005; Juhasz et al. 2014; Wadhwa et al. 2002). Ob PTHrP auch durch zyklische Kompression von humanem Knorpelgewebe induziert wird, ist bislang unklar.

PTHrP kann stimulierende oder inhibierende Wirkungen auf die Differenzierung von Chondrozyten und die EZM-Synthese haben. Aus der Embryonalentwicklung der Maus ist bekannt, dass PTHrP als parakriner Faktor die Proliferation von Chondrozyten antreibt und ihre Differenzierung verzögert (Minina et al. 2001). Eine Behandlung von ATDC5-Zellen mit 10 nM

hPTHrP(1-141) von Tag 4-12 resultierte in einer Inhibition der Kondensation der Zellen (Shukunami et al. 1996). Anhand eines PTHrP^(-/-)-Knock-out-Mausmodells konnte gezeigt werden, dass PTHrP in der Wachstumsfuge die Reifung von Chondrozyten hemmt (Vortkamp et al. 1996). Eine Stimulation von Chondrozyten aus Hühnerembryonen mit 100 nM PTHrP für 6 Tage inhibierte die Reifung der Zellen begleitet von einer supprimierten *Bmp6*- und *Col10a1*-Expression und ALP-Aktivität (Grimsrud et al. 1999). Jedoch wurde in murinen Rippenknorpel-explantaten von PTHrP^(-/-)-Knock-out-Mäusen eine um 95-96 % reduzierte GAG-Synthese verglichen mit dem Niveau im Wildtyp bestimmt (Ogihara et al. 2001), was auf eine anabole Wirkung von PTHrP hindeutet. Somit könnte der PTHrP-Signalweg die EZM-Synthese im Zuge der Mechanoadaptation beeinflussen. Bislang liegen jedoch keine Studien vor, die eine Mechanoinduktion von PTHrP mit einer Regulation der EZM-Synthese in Verbindung gebracht haben.

Das PTHrP-Protein kommt in Isoformen verschiedener Länge vor (PTHrP(1-34), PTHrP(1-84), PTHrP(1-108) und PTHrP(1-141)) (Martin et al. 2021). Die ersten 36 Aminosäuren (-36 bis -1) der PTHrP-Sequenz bilden eine Leit-/Prä- und Pro-Sequenz, die für den intrazellulären Transport zuständig ist und in mehreren Schritten bei der Prozessierung abgespalten wird. Die ersten 13 Aminosäuren der N-terminalen Sequenz zeigen eine hohe Sequenzhomologie zum Parathormon (PTH) (Burtis 1992). Die Aminosäuren 14 bis 34 zeigen zwar keine Sequenzhomologie, aber eine hohe Strukturähnlichkeit zu PTH, was die Bindung des gemeinsamen PTH-Rezeptors (PTH1R) ermöglicht (Caulfield et al. 1990; Martin et al. 2021). PTH1R ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der hauptsächlich über die Gs alpha-Untereinheit (Gas) wirkt. Durch Bindung von PTHrP an PTH1R wird somit die Adenylylcyclase aktiviert, die Adenosin triphosphat (ATP) zu cAMP umsetzt. Der Second Messenger cAMP ist ein kurzlebiges Molekül, das rasch durch Phosphodiesterasen abgebaut wird. Im nächsten Schritt aktiviert cAMP die PKA, die aus je zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht. Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA resultieren in einer Konformationsänderung, die zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten führt. Diese phosphorylieren anschließend nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich *cAMP Responsive Element Binding Protein* (CREB), die die Transkription von Zielgenen aktivieren (Kronenberg 2006; Martin et al. 2021).

Um den Beitrag des PTHrP-Signalwegs in der Mechanoadaptation zu untersuchen, können verschiedene Inhibitoren des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs verwendet werden. PTHrP-Analoga mit gekürzter N-terminaler Sequenz (PTHrP(3-34), PTHrP(7-34)) dienen als kompetitive Antagonisten, da ihre Bindung an PTH1R keine vollständige Stimulation des Gas-vermittelten Signalwegs auslöst (Burtis 1992). Downstream kann der Beitrag des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs durch Inhibitoren der Adenylylcyclase, wie MDL-12,330A (Guellaen et al. 1977; Johnson et al. 2021; Johnson et al. 2018), und Inhibitoren der PKA, wie H89 (Lochner und Moolman 2006; Murray 2008), gehemmt werden.

Somit stellt auch der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg einen wichtigen mechanosensitiven Signalweg in Chondrozyten dar, der die EZM-Synthese beeinflussen könnte und so einen Einfluss auf die Mechanoadaptation haben könnte.

Alles in allem umfasst die Mechanokompetenz von Knorpel somit drei wesentliche Aspekte. Neben dem rein physikalischen Aspekt der Mechanokopplung, die von den mechanischen Eigenschaften des Gewebes wie der Härte abhängt und die durch den GAG-Gehalt maßgeblich bestimmt wird, sind die Mechanotransduktion und die Mechanoadaptation von besonderer Bedeutung für die biologische Mechanokompetenz von Knorpel. Die Mechanotransduktion wird vor allem durch Mechanorezeptoren wie Integrine, durch eine Aktivierung von Mechanotransduktionswegen wie ERK1/2 und die Expression mechanosensitiver Gene und von microRNAs beeinflusst. Die Mechanoadaptation umfasst Anpassungen des Zellmetabolismus in Reaktion auf mechanische Belastung. Dabei ist die EZM-Synthese von besonderer Wichtigkeit und wird in dieser Arbeit daher als Hauptzielparameter der Mechanoadaptation gesehen. Sie kann durch verschiedene mechanosensitive Signalwege beeinflusst werden, wie dem TGF- β , BMP-, NF κ B-, NO-, PGE₂- und PTHrP-Signalweg, deren Verbindung zur Mechanokompetenz bislang kaum untersucht ist. Die Stabilität von Knorpel unter Belastung hängt somit wesentlich von einem komplexen Zusammenspiel aus Mechanokopplung, Mechanotransduktion und Mechanoadaptation ab. Welche Signale und Signalwege darin eingreifen, ist bisher unzulänglich verstanden.

1.4 Knorpel Tissue Engineering

Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von artikulärem Knorpel, bedingt durch seine fehlende intrinsische Regenerationskapazität (Hunter 1743), wurde intensiv nach Methoden zur Herstellung von Knorpelersatzgewebe gesucht. Der Begriff des Tissue Engineerings (TE) wurde 1988 beim ersten offiziellen Tissue Engineering Meeting definiert als die Anwendung von Methoden der Lebens- und Ingenieurwissenschaften zum grundlegenden Verständnis der Struktur-Funktionsverhältnisse in normalen und pathologischen Geweben und zur Entwicklung von biologischem Gewebe zum Ersatz, zum Erhalt oder zur Verbesserung der Gewebefunktion (Langer und Vacanti 1993; Nerem 1991). Das bedeutet, dass beim Tissue Engineering neues Gewebe außerhalb des Körpers *in vitro* gezüchtet wird. Dazu werden Zellen aus Biopsien isoliert, *in vitro* vervielfältigt und neues Gewebe *in vitro* generiert. Die Gewebeformung kann durch den Einsatz von Biomaterialträgern und bioaktiver Faktoren wie Wachstumsfaktoren unterstützt werden (Berthiaume et al. 2011; Kuo et al. 2006; Vinatier et al. 2009). Das mittels Tissue Engineering hergestellte Knorpelersatzgewebe kann um eine Knochenersatzphase ergänzt werden, um den physiologischen Bedingungen im Gelenk möglichst nahezukommen. Dabei werden für die osteogene Phase häufig bio-resorbierbare synthetische Kalziumphosphate wie Hydroxyapatit oder β -Trikalziumphosphat (β -TCP) verwendet (Kamakura

et al. 2002). Die bevorzugten Zellquellen für die *in vitro* Züchtung von Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineering werden im Folgenden näher erläutert.

1.4.1 Zellquellen im Knorpel Tissue Engineering

1.4.1.1 Artikuläre Chondrozyten

Für die Herstellung von Knorpelersatzgewebe im Labor mittels Tissue Engineering werden bevorzugt artikuläre Chondrozyten (AC) verwendet, da sie unter den geeigneten Kulturbedingungen redifferenzieren und einen stabilen Chondrozytenphänotyp ausbilden (Johnstone et al. 2013). Expandierte AC werden dazu entweder in Hochdichtekultur, der sogenannten Pelletkultur (Giannoni et al. 2005; Johnstone et al. 1998) oder in Biomaterialträgern (Ballock und Reddi 1994; Benya und Shaffer 1982) kultiviert. Um den nativen Bedingungen des Gelenks im experimentellen Ansatz möglichst nahe zu kommen, wird in unserer Arbeitsgruppe seit Jahren ein Chondrozyten-besiedelter Kollagen I/III-Träger als Knorpelzone mit einem zellfreien Knochenersatzmaterial aus β -TCP stellvertretend für den subchondralen Knochen kombiniert und daraus mittels Tissue Engineering eine osteochondrale Einheit hergestellt. Jedoch stellen die geringe Zellverfügbarkeit und die Setzung eines neuen Knorpeldefekts für die Isolation autologer Chondrozyten ein erhebliches Problem für das Knorpel Tissue Engineering dar, so dass intensiv an der Verwendung alternativer Zellquellen wie z.B. nasale Chondrozyten (Acevedo Rua et al. 2021; Pelttari et al. 2017) oder mesenchymale Stromazellen (Johnstone et al. 2013; Johnstone et al. 1998; Pelttari et al. 2008; Pelttari et al. 2006; Richardson et al. 2016; Vinatier et al. 2009; Winter et al. 2003) für Knorpel TE Ansätze geforscht wird.

1.4.1.2 Mesenchymale Stromazellen (MSC)

Die Existenz von Knochenmarkstromazellen wurde zum ersten Mal durch eine Reihe von Studien von Friedenstein und Kollegen beschrieben. Dabei wurden plastikadhärente Zellen mit Fibroblasten-ähnlichem Phänotyp aus dem Knochenmark isoliert und ihr osteogenes *in vivo* Differenzierungspotenzial nachgewiesen (Owen und Friedenstein 1988). Der Begriff *Mesenchymal Stem Cells* (mesenchymale Stammzellen, MSC) wurde erstmalig von Arnold I. Caplan eingeführt (Caplan 1991). Seiner Definition nach sind MSC Vorläuferzellen mesenchymalen Ursprungs, aus denen alle mesodermalen Gewebearten, darunter Knorpel, Knochen, Muskel, Fettgewebe, die Dermis, Sehnen, Bänder oder Bindegewebszellen, die das Knochenmarkstroma bilden, entstehen (Caplan 1991; Caplan und Bruder 2001). Am besten charakterisiert sind adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Sie liegen an der äußeren Oberfläche der Sinusoide im Knochen vor, wo sie zur Stabilität der Blutgefäße beitragen. Ihr Transkriptom umfasst die Expression früher osteogener Marker und charakteristischer Gene für perivaskuläre Zellen (Bianco et al. 2013). Sie zeichnen sich durch ihre Multipotenz und ihre

Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, aus (Pittenger et al. 1999). Nach Isolation können sie *in vitro* sogenannte *Colony-Forming Unit Fibroblasts* (CFU-F) bilden, deren Multipotenz und Selbsterneuerungspotenzial *in vivo* bestätigt werden konnte (Owen und Friedenstein 1988). Eine einzige Zelle kann *in vivo* die heterotope Knochenbildung oder die Ossikelbildung initiieren, einschließlich eines Kompartiments von perivaskulären Stromazellen mit einem ähnlichen Phänotyp und Eigenschaften der ursprünglich explantierten Zelle (Sacchetti et al. 2007). Dieses *in vivo* Potenzial bezieht sich jedoch ausschließlich auf skelettales Gewebe und benötigt keine exogene Stimulation mit Wachstumsfaktoren, um das skelettales Transkriptionsprogramm zu induzieren. Somit können Knochen- und Knorpelgewebe, Adipozyten, Fibroblasten und das Hämatopoese-fördernde Stroma *in vivo* mittels geeigneter Transplantationsassays aus einer einzigen Zelle gebildet werden (Bianco et al. 2013; Bianco et al. 2008). Ein alternatives Konzept beschreibt MSC als Vorläuferzellen aller nicht-epithelialen, nicht-hämatopoetischen Gewebe aus dem Mesoderm (Caplan 1994) mit der Annahme, dass diese Vorläuferzellen nicht nur im Knochenmark, sondern in allen postnatalen Organen vorliegen (da Silva Meirelles et al. 2006). Jedoch wurde dieses Konzept bislang nicht zufriedenstellend experimentell bewiesen, weshalb MSC ausschließlich als Vorläuferzellen skelettalen Gewebes angesehen werden sollten (Bianco et al. 2013). Die Identität von mesenchymalen Stammzellen muss laut Bianco et al. durch passende *in vivo* Transplantationsexperimente und Einzelzellassays bestätigt werden, da die Bedingungen *in vitro* die natürliche Situation *in vivo* nicht ausreichend simulieren können (Bianco et al. 2013). Um sich von den fragwürdigen Stammzeleigenschaften mesenchymaler Zellen aus dem Knochenmark zu distanzieren, wurde der Begriff *Mesenchymal Stromal Cells* (mesenchymale Stromazellen, ebenfalls abgekürzt mit MSC) vorgeschlagen (Bianco et al. 2008).

Charakterisierung von MSC *in vitro*

Zur Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen nach Isolation aus dem Knochenmark oder aus Fettgewebe werden standardmäßig drei *in vitro* Kriterien nach Dominici et al. überprüft. Dabei wird neben ihrer Plastikadhärenz auch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker analysiert. Demnach sollten ≥ 95 % der isolierten Zellpopulation positiv auf die Oberflächenmarker (*Cluster of Differentiation*, CD) CD105 (Endoglin), CD90 (Thy-1) und CD73 (Ekto 5' Nukleotidase) getestet werden und ≤ 2 % der Zellpopulation sollten die Oberflächenmarker CD34 und CD45 (Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C, PTPRC) besitzen. CD34 ist ein Oberflächenmarker für primitive hämatopoetische Vorläuferzellen und Endothelzellen, CD45 ist ein Pan-Leukozytenmarker. Das dritte Kriterium beschreibt die Differenzierbarkeit der MSC unter bestimmten *in vitro* Kulturbedingungen in die adipogene, osteogene und chondrogene Linie (Dominici et al. 2006). Auch wenn diese Kriterien als zu vage kritisiert werden (Bianco et al. 2013), können sie der Charakterisierung der isolierten Zellpopulationen dienen. Da MSC eine heterogene Zellpopulation darstellen, die u.a.

unterschiedliche Proliferationsraten und Oberflächenmarkerexpressionen umfasst, ist eine Charakterisierung der isolierten Zellen wichtig (Bianchi et al. 2003; Lee et al. 2010). Daher ist es beim Einsatz von humanen MSC aus Knochenmark *in vitro* stets erforderlich, die drei Kriterien nach Dominici et al. zu prüfen.

Einsatz von MSC im Knorpel Tissue Engineering

Aufgrund ihres hohen Proliferationspotenzials und ihrer minimal-invasiven Isolation stellen MSC auch eine interessante Zellquelle für Knorpel Tissue Engineering Ansätze dar (Dickhut et al. 2009; Kuo et al. 2006). Mithilfe chondrogener Differenzierungsprotokolle, die basierend auf einer Hochdichtekultur der MSC in sogenannten Pellets von Johnstone et al. etabliert (Johnstone et al. 1998) und seitdem in zahlreichen Studien eingesetzt wurden (Barry et al. 2001; Sekiya et al. 2002; Winter et al. 2003) ist es möglich, knorpeliges Gewebe *in vitro* herzustellen. Dabei ist eine Stimulation mit exogenem TGF- β zwingend erforderlich, da der TGF- β -Signalweg essenziell für die chondrogene Differenzierung ist. Wie AC exprimieren MSC-basierte Chondrozyten dann typische chondrogene Marker wie *COL2A1* und *ACAN* (Winter et al. 2003). Allerdings folgen MSC *in vitro* unter den derzeit verwendeten Differenzierungsprotokollen der enchondralen Linie und bilden somit mit fortschreitender Reifung einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp aus (Dexheimer et al. 2012; Winter et al. 2003), wie er für transienten Knorpel der Wachstumsfuge bekannt ist (Kronenberg 2003). Aus MSC entstandene Chondrozyten exprimieren somit hypertrophe Marker wie *COL10A1* und *MEF2C*, terminale Differenzierungsmarker wie die *MMP13*, sowie osteogene Marker wie die *ALPL* und *Bone Sialo Protein (IBSP)* (Barry et al. 2001; Dreher et al. 2020; Pelttari et al. 2006; Winter et al. 2003). Nach Implantation des Knorpelersatzgewebes *in vivo*, z.B. in subkutane Taschen immundefizienter Mäuse, führt dies zu einer Mineralisierung des generierten Knorpelgewebes (Pelttari et al. 2006), was für die Therapie von Knorpeldefekten unerwünscht ist.

Für die Verwendung von MSC in osteochondralen Tissue Engineering Ansätzen muss darauf geachtet werden, dass das verwendete Knochenersatzmaterial die EZM-Ablagerung in der Knorpelersatzphase nicht beeinträchtigt. So zeigten hohe extrazelluläre Kalziumkonzentrationen einen supprimierenden Effekt auf die GAG- und Kollagen Typ II-Ablagerung MSC-basierter Chondrozyten (Mellor et al. 2015; Sarem et al. 2018). Eine andere Studie zeigte jedoch eine erhöhte Knorpelbildung durch extrazelluläres Kalzium in Hühnerextremitätsknospen in *in vitro* Kultur (San Antonio und Tuan 1986). Demzufolge sollte im osteochondralen Tissue Engineering mit MSC stets der Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die Ablagerung knorpeltypischer EZM-Moleküle geprüft werden.

Insgesamt kann sowohl mit AC als auch mit MSC Knorpelersatzgewebe hergestellt werden. Die Vorteile von AC umfassen die gute Redifferenzierbarkeit und den stabilen Chondrozytenphänotyp, während MSC aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und hohen Proliferationsraten

bevorzugt werden. Bei der Wahl der Zellquelle für die Züchtung von Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineering wurde bislang leider häufig außer Acht gelassen, wie die Zellen auf mechanische Belastung reagieren, und wie es um die Funktionalität des Knorpelersatzgewebes bestellt ist.

1.5 Funktionelles Knorpel Tissue Engineering

Die Qualität von *in vitro* generiertem Knorpelersatzgewebe aus AC und MSC-basierten Chondrozyten wurde bislang fast ausschließlich anhand der Ablagerung der typischen Knorpelmatrixmoleküle und der chondrogenen Differenzierung der Zellen bewertet. Ob die Zellen während ihrer Differenzierung auch die für native Gelenkchondrozyten typischen Mechanotransduktions- und Mechanoadaptierungseigenschaften erwerben, die für ihre Funktion im Gelenk essenziell sind, ist zum derzeitigen Stand nicht bekannt.

Das Funktionelle Tissue Engineering zielt darauf ab, die für die mechanische Gewebefunktion benötigten biomechanischen Parameter zu definieren und Ersatzgewebe mit den passenden anatomischen und mechanischen Eigenschaften zu entwickeln (Guilak et al. 2001). Um die mechanische Funktion von Knorpelersatzgewebe, das mittels Tissue Engineering hergestellt wurde, zu untersuchen, wurden zahlreiche Belastungsprotokolle mit unterschiedlichen Amplituden, Frequenzen, Belastungsdauern, Vorkulturzeiten und Nachkulturzeiten eingesetzt (Anderson und Johnstone 2017). Da Kompression die relevanteste physikalische Kraft für nativen Knorpel ist (Grodzinsky et al. 2000), werden Kompressionsprotokolle bevorzugt zur Simulation physiologischer Belastung bei Knorpelersatzgewebe eingesetzt. Kompressionsprotokolle können im *confined* oder *unconfined* Modus angewandt werden. Bei der *confined compression* wird das Gewebe seitlich fixiert, so dass keine Deformation zu den Seiten erfolgen kann. Wird das Gewebe seitlich nicht begrenzt und somit unter Belastung eine Deformation zu den Seiten erlaubt, wird von *unconfined compression* gesprochen. Die *unconfined compression* wird bei *in vitro* Studien bevorzugt verwendet, da sie eine ausreichende Nährstoffversorgung des Knorpelersatzgewebes ermöglicht und die Situation in nativem Knorpel besser widerspiegelt (Delaine-Smith und Reilly 2011). Ein wichtiger Aspekt in Kompressionsstudien ist zudem, ob die Kompression statisch oder dynamisch appliziert wird. Statische Kompression führte dabei in verschiedenen Studien zu einem Abbau des Knorpelgewebes, während dynamische Kompression, die die native Situation im Knorpel bei der Gelenkbewegung eher widerspiegelt, den Knorpelerhalt förderte (Anderson und Johnstone 2017; Grodzinsky et al. 2000). Bei der Wahl zwischen AC und MSC als Zellquelle für den Knorpelgewebeersatz sollte nicht länger außer Acht gelassen werden, wie die Zellen auf mechanische Belastung reagieren, damit die adaptive Funktion des Knorpels gewährleistet wird. Sowohl AC- als auch MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde zwar bereits in zahlreichen Belastungsstudien auf seine mechanische Steifigkeit untersucht (Anderson und Johnstone 2017; Fahy et al. 2018). Dabei lag der Fokus vor allem auf der physikalischen Widerstandskraft des Knorpelersatzgewebes,

also auf der Mechanokopplung. Unsere Arbeitsgruppe hat damit begonnen, für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe bereits wesentliche Aspekte der Mechanotransduktion und Mechanoadaptation aufzuklären (Hecht et al. 2019; Praxenthaler et al. 2018; Scholtes et al. 2018). Für MSC-basierte Chondrozyten existieren jedoch noch bedeutende Wissenslücken, die für die Herstellung von funktionellem Knorpelersatzgewebe dringend geschlossen werden müssen.

1.5.1 Mechanische Belastung von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe

1.5.1.1 Mechanokopplung in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Die Mechanokopplung wird maßgeblich durch den GAG-Gehalt und die damit verbundene Härte beeinflusst. So zeigten Vorarbeiten, dass eine steigende Gewebeausreifung und damit zunehmende Härte signifikant mit dem GAG-Gehalt von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe korrelierte (Praxenthaler et al. 2018). Auch andere schlussfolgerten, dass eine Vorkulturdauer über mehrere Wochen für Belastungsstudien mit Knorpelersatzgewebe nötig sind (Jeon et al. 2013). Eine ausreichend lange Vorkulturdauer ist somit wichtig, um den Chondrozyten eine adäquate Matrixablagerung zu ermöglichen. Um die Mechanotransduktion und Mechanoadaptation in Knorpelersatzgewebe systematisch analysieren zu können, muss also darauf geachtet werden, dass die Mechanokopplung in Vergleichsgruppen möglichst standardisiert wird und während der Belastung konstant gehalten wird.

1.5.1.2 Mechanotransduktion in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe

ERK1/2 in AC

Für die Mechanotransduktion wird, wie im nativen Knorpel, eine ERK1/2-Aktivierung als eine der relevantesten Mechanotransduktionskaskaden angesehen und sollte daher in Belastungsstudien stets berücksichtigt werden (Iqbal und Zaidi 2005; Jalali et al. 1998; MacKenna et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Takahashi und Berk 1996; Yamazaki et al. 1995). Die Mechano-sensitivität von ERK1/2 und p38 wurde bereits für verschiedene Belastungsprotokolle und Knorpelersatzgewebe mit murinen (Bougault et al. 2008; Bougault et al. 2009), bovinen (Li et al. 2003) und humanen Chondrozyten (Xie et al. 2021) berichtet. Die bisherigen Arbeiten unserer Gruppe zeigten für humanes AC-basiertes Knorpelersatzgewebe bereits eine konsistente pERK1/2-Stimulation bei Verwendung verschiedener Belastungsprotokolle, sofern die Vorkulturdauer eine ausreichende Härte und GAG-Ablagerung ermöglichte (Hecht et al. 2019; Scholtes et al. 2018).

Mechanosensitive Gene in AC

In Vorarbeiten charakterisierten wir für 35 Tage vorkultiviertes Knorpelersatzgewebe aus humanen AC erstmals die globale Genexpression nach mechanischer Belastung (Scholtes et al. 2018). Dabei wurde AC-basiertes Knorpelersatzgewebe einer dreistündigen dynamischen Kompressionsepisode ausgesetzt und mittels cDNA-Array analysiert. Es wurden 115 Gene identifiziert, deren Expression durch die Belastung reguliert war. Dabei waren 114 Gene signifikant hochreguliert, 48 davon höher als zweifach. Unter den über zweifach stimulierten Genen befanden sich die mit dem MAPK-Signalweg assoziierten *Activator Protein-1* (AP-1) Transkriptionsfaktoren *FOS* und *FBJ Murine OsteoSarcoma Viral Oncogene Homolog B* (*FOSB*), die als *Immediate early* Gene beschrieben sind (Scholtes et al. 2018). Somit konnte die in einer Studie von Bougault et al. mit murinen Chondrozyten in Agarose unter dynamischer Kompression (20-40 kPa, 0,5 Hz, 30 min) beschriebene Mechanosensitivität von *Fos* und *FosB* bestätigt werden (Bougault et al. 2012). Auch in humanen Desmodontzellen in einem Polylactid-co-Glycolid (PLGA)-Träger wurde nach 24 h unter statischer Kompression von 25 g/cm² eine gesteigerte *FOS*- und nach 72 h zusätzlich eine gesteigerte *FOSB*-Expression beobachtet (Li et al. 2013). Parallel zu *FOS* und *FOSB* wurden in der Studie von Scholtes et al. Antagonisten des MAPK Signalwegs, *DUSP5/6*, stimuliert. Damit sind diese Gene als gängige mechanosensitive Gene anzusehen, auf deren Basis die Mechanotransduktion näher charakterisiert werden kann.

Die Studie von Scholtes et al. zeigte zudem eine Steigerung der Genexpression weiterer Gene durch das verwendete Belastungsprotokoll. So wurde erstmalig auch eine Mechanoinduktion des WNT-assoziierten *AXUD1*, des dem Retinsäuresignalweg zugeordneten *NR4A2* in Knorpelersatzgewebe und des als NFκB-Zielgen beschriebenen Gens *COX2/PTGS2* in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe beschrieben. Gleichzeitig wurde erstmals eine Mechanoinduktion von *BMP2* und *BMP6* in humanem AC-basiertem Knorpelersatzgewebe beobachtet (Scholtes et al. 2018). Eine bereits beschriebene Mechanosensitivität von *SOX9* in humanen Chondrozyten unter dynamischer Kompression (10% zyklische Kompression + 10% Vorkompression, 7 Tage) in einem Kollagen Typ I-Träger (Diao et al. 2017) wurde auch von Scholtes et al. in unserem Knorpelersatzgewebe beobachtet (Scholtes et al. 2018). In einer anderen Studie von Wong et al. mit bovinen Chondrozyten in Alginategelen wurde jedoch keine Induktion der *Sox9*-Expressionsspiegel nach hydrostatischem Druck oder zyklischer Dehnung berichtet (Wong et al. 2003). Somit können neben einzelnen gängigen nun auch weitere mechanosensitive Gene für eine nähere Charakterisierung der Mechanotransduktion herangezogen werden.

Mechanosensitive microRNAs in AC

Auch epigenetische Regulationsmechanismen können durch mechanische Belastung aktiviert werden. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe bewies die zuvor in der Literatur nur vermutete Mechanosensitivität von miR-221 und identifizierte mithilfe einer microRNA-Array-Analyse

nach zyklischer Kompression von humanem AC-basiertem Knorpelersatzgewebe sieben weitere miRs, die durch Belastung signifikant stimuliert wurden. Dabei zeigten miR-221, miR-6872-3p und miR-6723-5p die robusteste Mechanosensitivität im Knorpelersatzgewebe (Hecht et al. 2019). Ob diese miRs als epigenetische Regulatoren einen Einfluss auf die Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung in Knorpelersatzgewebe haben, wurde bis dato nicht entschlüsselt. Somit können auch Mechano-miRs für die quantitative Analyse der Mechanotransduktion untersucht werden.

Insgesamt stehen somit für eine quantitative Beurteilung der Mechanotransduktion in *in vitro* generiertem Knorpelersatzgewebe neben der Aktivierung von ERK1/2 auch die Regulation der Expression gängiger und ergänzender mechanosensitiver Gene sowie von miRs zur Verfügung.

1.5.1.3 Mechanoadaptierung in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe

EZM-Synthese in AC

Die Mechanoadaptierung von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe wurde anfänglich in mehreren Studien mit tierischen Chondrozyten erforscht. Auf metabolischer Ebene zeigten schon 1995 Buschmann et al. für bovine Chondrozyten in Agarose, dass 1 % zyklische Kompression und Frequenzen zwischen 0,0001 und 1 Hz für 10 h bei einer Vorkulturdauer von bis zu 42 Tagen die Proteoglykan- und Kollagensynthese, ermittelt durch den Einbau von radioaktiv-markiertem $^{35}\text{SO}_4$ bzw. ^3H -Prolin, steigern (Buschmann et al. 1995). In einer Studie von Lee und Bader mit bovinen Chondrozyten in Agaroseträgern, die nur 16 h vorkultiviert wurden, zeigte sich eine frequenzabhängige Regulation der GAG-Ablagerung, die bei 0,3 Hz reduziert und bei 1 Hz stimuliert war, und eine Reduktion der Kollagensynthese bei einer 48-stündigen Kompression mit einer Amplitude von 15 % und Frequenzen zwischen 0,1 und 3 Hz (Lee und Bader 1997). In Studien mit humanen Chondrozyten wurden je nach gewähltem Belastungsprotokoll anabole (Jeon et al. 2012; Jeon et al. 2013; Nebelung et al. 2011), neutrale (Diao et al. 2017; Nebelung et al. 2012) oder katabole (Demartean et al. 2003; Grogan et al. 2012) Effekte auf den Stoffwechsel und die EZM-Synthese beobachtet. Die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Parameter der Belastungsprotokolle, bestehend aus Belastungsart, Amplitude, Frequenz und Dauer, erschweren einen Vergleich der Studien und verdeutlichen die Schwierigkeit, gezielt ein Belastungsprotokoll mit anabolem Effekt zu etablieren, um den Knorpelaufbau fördern zu können. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden daher mehrere Belastungsprotokolle an AC-basiertem Knorpelersatzgewebe, das 21 oder 35 Tage vorkultiviert wurde, getestet. Dabei wurde eine dreistündige zyklische Belastungsepisode identifiziert, die auf 35 Tage vorkultiviertes AC-basiertes Knorpelersatzgewebe einen anabolen Effekt ausübte, gemessen an einer Stimulation der GAG-Synthese durch $^{35}\text{SO}_4$ -Einbau über 24 h nach Belastungsende. Es wendete eine Amplitude von 25 % überlagert auf eine

Vorkompression von 10 % mit einer Frequenz von 1 Hz in zehnminütigen intermittierenden Intervallen zwischen Belastungs- und Ruhephase an (Scholtes et al. 2018). Dieses Belastungsprotokoll simulierte die Belastung im humanen Kniegelenk bei dreistündigem Gehen in zehnminütigen Intervallen. Die sorgfältige Charakterisierung dieses Belastungsprotokolls zeigte, dass die Chondrozyten nach 3 Tagen Kultur in einem Kollagen Typ I/III Träger bei noch sehr geringer EZM-Ablagerung und niedriger Härte auf die Belastung mit einer gestörten GAG-Synthese reagierten. Im Gegensatz dazu behielt 21 Tage vorkultiviertes Knorpelersatzgewebe nach Belastung die GAG-Synthese bei, während es nach 35 Tagen auf die Belastung mit einer Stimulation der GAG-Synthese reagierte. Als Schwellenwert wurde ein GAG-Gehalt von 600 µg pro Probe ermittelt, ab dem durch diese spezielle Belastungsepisode in unserem Modell eine signifikante Stimulation der GAG-Synthese erfolgte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Belastungsprotokoll für 21 bzw. 35 Tage vorkultiviertes AC-basiertes Knorpelersatzgewebe als physiologisch bewertet. Die Vorkulturdauer beeinflusste also maßgeblich die Reaktion der Chondrozyten auf die mechanische Belastung. Um mechanokompetentes Knorpelersatzgewebe *in vitro* herzustellen, in dem die Chondrozyten in der Lage sind, trotz mechanischer Belastung die EZM-Synthese aufrechtzuerhalten oder zu steigern, mussten also eine ausreichende GAG-Ablagerung und Härte gewährleistet sein. Somit hängt auch unter *in vitro* Bedingungen eine Mechanokopplung maßgeblich von der Härte und dem GAG-Gehalt des Knorpelersatzgewebes ab.

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der Knorpelhomöostase stellt die Beibehaltung oder Steigerung der EZM-Synthese unter oder nach Belastung ein wichtiges Kriterium für mechanokompetentes Knorpelersatzgewebe dar und sollte in Belastungsstudien stets analysiert werden. Bisherige Belastungsstudien mit humanem AC-basiertem Knorpelersatzgewebe untersuchten jedoch vorwiegend die EZM-Ablagerung nach mechanischer Belastung und nicht die EZM-Synthese, so dass die molekularen Mechanismen der Mechanoadaptierung bislang nur ansatzweise bekannt sind.

Anabole und katabole Signalwege in AC

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, beeinflussen verschiedene anabole und katabole Signalwege die EZM-Synthese, die als wichtigster Mechanoadaptierungsparameter angesehen werden kann. Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit humanem AC-basiertem Knorpelersatzgewebe ist bekannt, dass sich weder die TGF- β - noch die BMP-Signalwegsaktivität auf Proteinebene durch die anabole Belastungsepisode an Tag 3, 21 und 35 änderte. Dagegen wurde SOX9 auf Proteinebene an Tag 21 und Tag 35 durch die Belastung stimuliert (Praxenthaler et al. 2018; Scholtes et al. 2018). Demzufolge könnte eine SOX9-Stimulation einen empfindlicheren Parameter zur Beurteilung der Mechanoadaptierung darstellen als die TGF- β - und BMP-Signalwegsaktivität.

Bislang wurden Signalwege, die eine katabole Wirkung haben und die EZM-Synthese inhibieren oder einen Einfluss auf SOX9 haben könnten, von uns nicht in die Charakterisierung der Belastungsantwort von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe einbezogen; eine Lücke, die dringend geschlossen werden sollte. Neben den katabolen Signalwegen NF κ B und NO gilt es auch COX2/PGE₂ und den PTHrP-Signalweg zu analysieren, denen teils katabole und anabole Wirkungen je nach Kontext zugesprochen werden.

Ob physiologische Belastung in Abwesenheit pro-inflammatorischer Stimuli den NF κ B-Signalweg in Knorpelersatzgewebe aktiviert, ist bislang unklar. Da der NF κ B-Signalweg die EZM-Synthese beeinträchtigen könnte, sollte er in die Charakterisierung der Mechanoadaptation eingeschlossen werden.

Die Mechanosensitivität von NO wurde bislang für humane Chondrozyten nur unter Scherbelastung (Lee et al. 2003) und hydrostatischem Druck (24 MPa, 3 h) beobachtet (Fioravanti et al. 2010). Allerdings zeigten mehrere Studien ohne Anwendung von Belastung, dass NO die Synthese von Proteoglykanen in humanen Chondrozyten inhibieren kann (Hauselmann et al. 1994; Studer et al. 1999), so dass eine belastungsinduzierte NO-Produktion die Mechanoadaptation von Knorpelersatzgewebe beeinflussen könnte.

Mit unserem AC-basierten Knorpelersatzgewebe wurde eine Mechanoinduktion von COX2 bzw. *PTGS2* nach 35 Tagen Vorkultur in Antwort auf die anabole Belastungsepisode beobachtet (Scholtes et al. 2018), jedoch wurde diese nicht näher untersucht. Daher ist nicht bekannt, ob sich diese Stimulation von COX2 auch in erhöhte PGE₂-Spiegel übersetzte. Da der COX2/PGE₂-Signalweg anabole oder katabole Wirkungen auf die EZM-Synthese haben könnte, sollte dieser bei der Analyse der Mechanoadaptation betrachtet werden.

Diverse Belastungsstudien konnten eine Mechanoinduktion von PTHLH in Chondrozyten verschiedener Spezies durch zyklische Dehnung (Han et al. 2014; Sun et al. 2017; Tanaka et al. 2005; Wang et al. 2011; Xu et al. 2013), Flüssigkeitsscherbelastung (Ogawa et al. 2014) oder statischem Druck (Huang et al. 2015) zeigen. Allerdings wurde eine Induktion des PTHrP-Signalwegs durch zyklische Kompression in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Da PTHrP ein bekannter Regulator der Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge ist (Kronenberg 2006), könnte eine belastungsinduzierte Stimulation von PTHrP die Mechanoadaptation von Knorpelersatzgewebe beeinflussen.

Somit wurde die Belastungsregulation relevanter anaboler Signalwege, wie dem TGF- β und BMP-Signalweg, in Chondrozyten bereits untersucht. Bedeutende Wissenslücken bestehen in der Belastungsregulation wichtiger kataboler Signalwege, wie dem NF κ B-Signalweg und NO, sowie von COX2/PGE₂- und dem PTHrP-Signalweg, und ihrem Einfluss auf die EZM-Synthese.

1.5.2 Mechanische Belastung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

1.5.2.1 Mechanokopplung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Der Effekt mechanischer Belastung wurde auch für MSC-basierte Knorpel Tissue Engineering Ansätze in zahlreichen Studien untersucht (Fahy et al. 2018). Die meisten Studien verfolgten dabei das Ziel, durch Anwendung mechanischer Belastung die Supplementierung mit exogenem TGF- β , welches für die chondrogene Differenzierung von MSC essenziell ist, zu ersetzen (Behrendt et al. 2020; Gardner et al. 2017; Monaco et al. 2021; Pelaez et al. 2009; Schatti et al. 2011; Schiavi et al. 2018). Dabei wurde eine leichte Steigerung der GAG-Produktion unter Belastung beobachtet, jedoch konnte kein Knorpelersatzgewebe mit einer homogenen, Proteoglykan-reichen Matrix ohne TGF- β aus MSC hergestellt werden. Andere Studien verfolgten das Ziel, die physikalische Mikroumgebung des Gelenks zu imitieren und durch wiederholte mechanische Belastungsepisoden die mechanische Stabilität des Knorpelersatzgewebes zu fördern (Bian et al. 2012; McDermott et al. 2021; Sawatjui et al. 2018). Da das Knorpelersatzgewebe nicht oder nur kurz vorkultiviert wurde und die Zellen erst im Zuge der Kultur EZM-Moleküle ablagerten, wurde die Mechanokopplung in diesen Studien vorwiegend durch die verwendeten Trägermaterialien (Fibrin, methacrylierte Hyaluronsäure, Komposit aus Seidenfibroin mit Chondroitinsulfat, Gelatine und Hyaluronsäure) bestimmt. Von McDermott et al. wurde eine längere Vorkulturdauer von bis zu 6 Wochen gewählt (McDermott et al. 2021), um den Zellen eine Produktion und Ablagerung eigener knorpeltypischer EZM-Moleküle zu erlauben, die die Mechanokopplung von nativem Knorpel maßgeblich beeinflussen (Grodzinsky et al. 2000). Dabei stieg der Equilibrium Modul und der dynamische Modul mit steigender Vorkulturdauer von bis zu 6 Wochen an (McDermott et al. 2021), womit, wie zu erwarten, der EZM-Gehalt die biomechanischen Eigenschaften auch für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe nachhaltig beeinflusste und somit einen wichtigen Mechanokopplungsparameter darstellt. Jedoch untersuchte keine dieser Studien, welche Mechanotransduktionsmechanismen durch die Belastung aktiviert werden.

1.5.2.2 Mechanotransduktion in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Die Frage, ob mechanische Belastung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe die gleichen Mechanismen der Mechanotransduktion aktiviert wie in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe, ist von großer Bedeutung für die Herstellung von funktionellem Knorpelersatzgewebe aus MSC. Eine Studie von Zhang et al. mit humanen MSC verfolgte das Ziel, die chondrogene Differenzierung durch Belastung zu fördern und den Beitrag des Integrin- und TGF- β /SMAD-Signalwegs zu untersuchen. Dazu wurde nach einer dreiwöchigen Vorkultur ein dreiwöchiges dynamisches Kompressionsprotokolls (5 % Kompression, 1 Hz, 2 h täglich) verwendet (Zhang

et al. 2015). Dabei beobachteten sie eine belastungsinduzierte Reduktion von Integrin- β 1, pFAK und pERK auf Proteinebene. Eine Studie von Pelaez et al. mit MSC-besiedelten Fibrin-gelen in Expansionsmedium verfolgte das Ziel, die Rolle des ERK-Signalwegs in der chondrogenen Differenzierung zu analysieren. Es ergab sich eine belastungsinduzierte Stimulation der SOX9 und ACAN Expression (10 % Kompression überlagert auf 5 % Vorkompression, 1 Hz, 6 h), die durch Inhibition von ERK1/2 antagonisiert werden konnte (Pelaez et al. 2012). Allerdings ist anhand der Studienlage nicht klar, ob ERK1/2 als bekannter Mechanotransduktionsweg auch in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe ähnlich wie bei AC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch mechanische Belastung aktiviert wird.

Auch die belastungsinduzierte Expression mechanosensitiver Gene wurde in humanem MSC-basiertem Knorpelgewebe bislang unzureichend untersucht. Lediglich die Mechanosensitivität von *c-Fos* wurde in MSC aus Kaninchen in Agarose unter dynamischer Kompression berichtet (Huang et al. 2005). Eine Stimulation der SOX9-Expression erfolgte nach dynamischer Belastung von humanen MSC (Cochis et al. 2017) und Kaninchen MSC (Huang et al. 2005). Somit ist für die Stimulation gängiger und ergänzender mechanosensitiver Gene in MSC-basierten Chondrozyten wenig bekannt. Da sie wichtige Parameter zur Charakterisierung einer erfolgten Mechanotransduktion darstellen, sollten sie auch für MSC-basierte Chondrozyten analysiert werden.

Zum aktuellen Stand existiert in der Literatur keine Studie, die mechanosensitive miRs nach dynamischer Kompression von humanem MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe analysiert hat. Da epigenetische Regulationsmechanismen wie miRs jedoch einen Einfluss auf die Mechanokompetenz von Knorpelersatzgewebe ausüben könnten, sollten sie in mechanischen Belastungsstudien mit MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe untersucht werden.

Somit ist bezüglich wichtiger Mechanotransduktionsparameter wie der ERK1/2-Aktivierung, der Stimulation von mechanosensitiven Gene sowie von Mechano-miRs durch mechanische Belastung für MSC weit weniger bekannt als für AC. Für den funktionellen Knorpelersatz unter Verwendung MSC-basierter Chondrozyten muss sichergestellt werden, dass eine Mechanotransduktion in Antwort auf Belastung erfolgt, damit das hergestellte Knorpelersatzgewebe die Funktion von nativem Knorpel erfüllen kann.

1.5.2.3 Mechanoadaptierung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten

Ob in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch mechanische Belastung die gleichen Mechanismen der Mechanoadaptierung aktiviert werden wie in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe, ist bislang nicht bekannt. Einige Studien konnten eine belastungsinduzierte Steigerung der Ablagerung von EZM-Molekülen in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe beobachten

(Sawatjui et al. 2018; Steinmetz et al. 2015; Zhang et al. 2015), jedoch wurde in keiner Studie die EZM-Neusynthese ermittelt oder ein direkter Vergleich mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe durchgeführt. Somit bleibt die unmittelbare Regulation des Zellmetabolismus durch mechanische Belastung, sowie mögliche Unterschiede zu AC-basiertem Knorpelersatzgewebe für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe unklar.

Anabole und katabole Signalwege in MSC-basierten Chondrozyten

Auch der Einfluss anaboler und kataboler Signalwege wurde bis dato kaum adressiert. Für den BMP-Signalweg wurde ein inhibierender Effekt mechanischer Belastung beschrieben, während es widersprüchliche Berichte zur belastungsinduzierten Regulation des TGF- β -Signalwegs gibt (Aisenbrey und Bryant 2019; Zhang et al. 2015). Ob mechanische Belastung den TGF- β - und BMP-Signalweg in MSC-basierten Chondrozyten reguliert und ob dies einen Einfluss auf die EZM-Synthese und somit auf die Mechanoadaptation hat, gilt es noch herauszufinden.

Weiter ist eine Mechanoinduktion des NF κ B-Signalwegs und von PGE₂ in humanen MSC-basierten Chondrozyten nicht untersucht. Aufgrund der katabolen und anti-chondrogenen Wirkung des NF κ B-Signalwegs könnte dieser die Mechanoadaptation von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe beeinflussen. PGE₂ kann die GAG-Produktion MSC-basierter Chondrozyten fördern (Biddulph et al. 1991; Biddulph et al. 2000; Capehart und Biddulph 1991; Gay und Kosher 1984; Kosher und Walker 1983; Pountos et al. 2021) und könnte so einen Einfluss auf die Mechanoadaptation haben. Eine belastungsinduzierte Produktion von NO wurde zwar bereits für MSC-basierte Chondrozyten berichtet (Gardner et al. 2016), jedoch ist unbekannt, ob Unterschiede zu AC vorliegen. Um Einflussfaktoren auf die Mechanoadaptation von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu identifizieren, sollte die NO-Produktion in beiden Knorpelersatzgeweben näher untersucht werden.

Obwohl die Mechanosensitivität des PTHrP-Signalwegs für AC bereits bekannt ist, gibt es bis dato keine Studie, die eine belastungsinduzierte Stimulation der *PTHLLH*-Expression in humanen MSC-basierten Chondrozyten beschreibt. Durch verschiedene Studien ist allerdings bekannt, dass der PTHrP-Signalweg einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung MSC-basierter Chondrozyten hat. Eine konstante PTHrP(1-34) Administration ab 0,4 bis 1 nM während der Chondrogenese humaner MSC in klassischer Pelletkultur resultierte in einem Differenzierungsstopp (Fischer et al. 2014; Mueller et al. 2013; Weiss et al. 2010). Interessanterweise hängt der Effekt von PTHrP(1-34) auf die Differenzierung von MSC von der Art der Administration ab, da eine intermittierende PTHrP(1-34)-Stimulation von 10 ng/mL (2,5 nM) für 6 h dreimal die Woche die EZM Ablagerung förderte (Fischer et al. 2014). Eine Optimierung der PTHrP(1-34)-Pulsdauer auf 2,6 h oder 6 h täglich konnte die Proteoglykanablagerung nochmals steigern und die Expression der hypertrophen bzw. osteogenen Marker *Indian Hedgehog (IHH)*, *MEF2C* und *IBSP* sowie die ALP-Aktivität reduzieren (Fischer et al. 2016).

Da der PTHrP-Signalweg die Differenzierung MSC-basierter Chondrozyten also je nach Kulturbedingungen fördern oder arretieren kann, könnte eine belastungsinduzierte *PTHLLH*-Expression die EZM-Synthese und so die Mechanoadaptation in gegensätzliche Richtungen lenken und dazu den Zellphänotyp beeinflussen.

Zellphänotyp von MSC-basierten Chondrozyten

Ein wichtiger Unterschied zwischen AC- und MSC-basierten Chondrozyten, ist der hypertrophe Chondrozytenphänotyp, der bei der *in vitro* Kultur von MSC unter chondrogenen Bedingungen auftritt. Dieser sollte bei der Charakterisierung der Mechanokompetenz von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nicht außer Acht gelassen werden. Da mechanische Reize einen wichtigen Faktor in der Knorpelentwicklung *in vivo* darstellen, verfolgten zahlreiche Studien das Ziel, die Knorpelneogenese MSC-basierter Chondrozyten mithilfe von wiederholter mechanischer Belastung zu steigern und gleichzeitig die Hypertrophie zu reduzieren, mit unterschiedlichem Erfolg je nach Kulturbedingungen und Belastungsprotokoll wie im Übersichtsartikel von Fahy et al. dargestellt (Fahy et al. 2018). Ob mechanische Belastung bereits nach einer einmaligen Belastungsepisode einen Effekt auf den hypertrophen Phänotyp MSC-basierter Chondrozyten hat, ist unklar. Somit kommt für MSC-basierte Chondrozyten mit der Analyse des Zellphänotyps ein weiterer Untersuchungsparameter hinzu, der für nativen Knorpel und AC-basiertes Knorpelersatzgewebe nicht relevant ist, aber wegen seines Bezugs zu Arthroseknorpel näher untersucht werden sollte.

Da ein Vergleich der Belastungsantwort von MSC-basierten Chondrozyten und AC in der Literatur bislang nicht im Fokus war, gibt es bis dato keine Belege, dass aus MSC hergestellte Chondrozyten vergleichbar auf mechanische Belastung reagieren können wie native AC. Eine ausreichende Mechanotransduktion und Mechanoadaptation von MSC-basierten Chondrozyten ist jedoch für die Funktion des mit ihrer Hilfe generierten Knorpelersatzgewebes und damit seine Reaktion auf mechanische Belastung essenziell. Aufgrund der Bedeutung der Mechanotransduktion und Mechanoadaptation für die Homöostase in einem Gelenk, für das eine MSC-basierte Knorpelregeneration in Frage kommt, sollten diese Wissensdefizite dringend geschlossen werden.

1.6 Knorpelschäden und -degeneration

Knorpelgewebe besitzt eine geringe intrinsische Regenerationskapazität bedingt durch fehlende Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven. Knorpelschäden, die u.a. durch mechanische Über- oder Fehlbelastung, Trauma oder genetische Prädisposition entstehen können, werden daher kaum regeneriert. Bei spontaner intrinsischer Knorpelreparatur bildet sich vorwiegend Faserknorpel, der durch einen hohen Anteil an Kollagen Typ I Fasern charakterisiert ist. Verglichen mit hyalinem Knorpel hat er minderwertige biomechanische Eigenschaften, so dass er

weniger stabil ist und langfristig die Gelenkfunktion nicht aufrechterhalten kann. Umschriebene Knorpelläsionen in gewichtstragenden Bereichen, z.B. im Kniegelenk, werden daher chirurgisch behandelt, um den Patient*innen eine Schmerzlinderung zu ermöglichen, die Knorpelfunktion aufrechtzuerhalten und die Entwicklung degenerativer Erkrankungen zu verzögern. Dazu wurden zellbasierte Therapien etabliert, um eine Regeneration des Knorpels mit möglichst nativen biomechanischen Eigenschaften zu erzielen (Erggelet und Vavken 2016; Khan et al. 2008).

1.6.1 Knorpeldefekte und zellbasierte Knorpeltherapien

1.6.1.1 Autologe Chondrozytenimplantation

Die Autologe Chondrozytenimplantation (ACI) nutzt AC, die aus makroskopisch intaktem Knorpelgewebe einer wenig gewichtstragenden Stelle desselben Gelenks der Patient*in isoliert werden. Sie wird vor allem bei jüngeren Patient*innen empfohlen und bei fokalen Defekten $>2 \text{ cm}^2$ eingesetzt. In einem ersten operativen Eingriff werden die AC isoliert, *in vitro* expandiert und in einem weiteren Eingriff in den fokalen Defekt implantiert. Allerdings haben AC ein geringes Proliferationspotenzial, so dass nur eine limitierte Zellzahl *in vitro* generiert werden kann. Durch die Isolation aus intaktem Knorpelgewebe wird ein neuer Defekt gesetzt, der wiederum nicht intrinsisch regeneriert werden kann. Die ACI erfordert somit einen zweistufigen Prozess, eine offene Arthrotomie und ist mit hohen Kosten und einer hohen Rate an Revisionen verbunden (Richter et al. 2016). Die expandierten Chondrozyten werden standardmäßig in einen Matrixträger, zumeist Kollagen Typ I bzw. I/III oder Hyaluronsäure-basierte Träger, gesiedelt (*Matrix-associated Autologous Chondrocyte Implantation/Transplantation*, MACI/T) und mit Fibrinkleber im Defekt fixiert (Schuette et al. 2017; Steinwachs 2009). Allerdings bildet sich auch bei dieser Methode häufig Faserknorpel, so dass die mechanische Funktion nicht adäquat erfüllt werden kann (Bentley et al. 2003; Khan et al. 2008).

1.6.1.2 Mikrofrakturierung

Eine weitere zellbasierte Therapieoption zur Füllung fokaler Defekte ist die Mikrofrakturierung, bei der zunächst ein Debridement durchgeführt und der kalzifizierte Knorpel entfernt wird. Dann werden kleine Löcher (Mikrofrakturen) ca. 4 mm tief im Abstand von etwa 3-4 mm in den subchondralen Knochen gebohrt, so dass das Knochenmark austritt. Im Knochenmark vorhandene primitive Vorläuferzellen können dann im Defekt neues Reparaturgewebe aufbauen. Des Weiteren zeigen MSC parakrine anti-inflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften (Harrell et al. 2019). Die Mikrofrakturierung zeichnet sich durch ihre minimalinvasive Technik, relativ geringe Kosten und eine geringe operative Morbidität aus (Steadman et al. 1997). Sie kann zwar eine Verbesserung der Symptome hervorrufen, allerdings kann die

Beständigkeit des vorwiegend aus Faserknorpel bestehenden Reparaturgewebes eingeschränkt sein, was langfristig zu einem Versagen des Reparaturknorpels führen kann (Erggelet und Vavken 2016; Kreuz et al. 2006; Richter et al. 2016).

Die derzeit angewandten zellbasierten Methoden zur Knorpeldefektfüllung bessern häufig die Beschwerden der Patient*innen. Weil sie keinen stabilen hyalinen Knorpel regenerieren können, der den auf das Gelenk wirkenden mechanischen Kräften langfristig standhalten kann, wird eine nachfolgende flächige Knorpeldegeneration bzw. Arthrose allerdings oft nur aufgeschoben und nicht dauerhaft verhindert. Welche Rolle dabei die Mechanokompetenz der Zellen spielt, wurde noch nicht entschlüsselt. Auch ist nicht bekannt, inwiefern sich die Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpel unterscheidet.

1.6.2 Osteoarthritis

Bei Über- und Fehlbelastung kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen im Knorpel kommen, was schließlich zu degenerativen Erkrankungen führen kann (Guilak 2011; Litwic et al. 2013; Musumeci et al. 2015; Visser et al. 2015). Die häufigste degenerative Gelenkerkrankung ist Osteoarthritis (OA). In Deutschland waren laut einer Studie des Robert Koch Instituts zwischen 2019 und 2020 39,7 % der Frauen und 23,2 % der Männer zwischen 65 und 79 Jahren und sogar 47,3 % der Frauen und 31,6 % der Männer über 80 Jahren von OA betroffen (Heidemann et al. 2021). Frühe OA zeichnet sich durch eine erhöhte Knorpelmatrixsyntheserate aus, um dem Verlust der Knorpelmatrixmoleküle entgegenzuwirken. In der späten OA sinkt die EZM Syntheserate, katabole Prozesse überwiegen und die Chondrozyten zeigen vermehrt einen hypertrophen Phänotyp, der durch die Expression hypertropher Marker wie *COL10A1* und *IHH* charakterisiert ist (Lorenz und Richter 2006). Des Weiteren erfolgt häufig eine Mineralisierung des Knorpels unter Bildung von Kalziumphosphatkristallen, die mit der Expression hypertropher Marker korrelieren und die Funktionalität des Knorpels zusätzlich einschränken (Carlson et al. 2017; Stücker et al. 2021).

Die Knorpeldegeneration ist durch die erhöhte Expression Matrix-abbauender Enzyme wie MMPs und Aggrecanasen (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs; ADAMTS*) und eine reduzierte Expression von *Tissue Inhibitor of Proteinase (TIMP)*, Inhibitoren der Matrix-abbauenden Proteinase, charakterisiert. Gefördert wird die Expression der degradierenden Enzyme durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, -17 und -18, sowie TNF- α (Anghelina et al. 2008; Lorenz und Richter 2006; Takahata et al. 2021). Diese pro-inflammatorischen Zytokine induzieren die Expression kataboler Mediatoren wie die iNOS, die NO produziert, sowie die Expression von MMP1, MMP3, MMP9 und MMP13. Zudem wird die Expression des Enzyms COX2, welches an der Produktion von PGE₂ beteiligt ist, stimuliert. Gleichzeitig wird die Produktion von Proteoglykanen inhibiert. Pro-inflammatorische Zytokine aktivieren den NF κ B-Signalweg, der wiederum in einer Feedbackschleife die Expression pro-

inflammatorischer Zytokine und matrixabbauender Enzyme fördert (Choi et al. 2019; Marcu et al. 2010). Hyperphysiologische Belastung ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von OA. Sie fördert die oben genannten inflammatorischen Prozesse und aktiviert den NFκB-Signalweg, wodurch der Knorpelkatabolismus in der OA verstärkt wird (Anghelina et al. 2008; Jorgensen et al. 2017). Aufgrund der Degeneration der Knorpelmatrix ändern sich die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes bei OA, so dass die Widerstandskraft gegenüber mechanischer Belastung sinkt und auch die Mechanokompetenz des OA-Knorpels beeinträchtigt ist und schließlich die Knorpel- und Gelenkfunktion nicht aufrechterhalten werden kann (Krishnan und Grodzinsky 2018).

1.6.2.1 Therapieoptionen bei OA

Neben der Behandlung von Knorpeldefekten werden verschiedene Therapieoptionen zur Behandlung von OA empfohlen. Diese reichen von physiotherapeutischer Behandlung über den Einsatz verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe wie Acetaminophen, Duloxetin, verschiedener nicht-steroidaler anti-inflammatorischer Wirkstoffe (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*, NSAIDs) zu intra-artikulär angewandten Corticosteroiden (Jang et al. 2021). Bei fortgeschrittener OA sind (Teil)endoprothesen oft nicht vermeidbar. Eine Endoprothese kann die Gelenkfunktion zunächst für mehrere Jahre bis Jahrzehnte aufrechterhalten, jedoch besteht eine hohe Revisionswahrscheinlichkeit aufgrund von Infektionen oder mechanischer Lockerung der Prothesen (Delanois et al. 2017). Daher ist das allgemeine Ziel der Prävention und Behandlung von Knorpeldefekten und OA, den nativen Knorpel möglichst zu erhalten bzw. zu regenerieren und den Gelenkersatz zu verhindern. Um die Gelenkfunktion beizubehalten ist es wichtig, dass die Therapieansätze dem Knorpel ermöglichen, den mechanischen Kräften standzuhalten und mit einer Synthese von EZM-Molekülen auf die Belastung zu reagieren, um verlorene EZM-Moleküle zu ersetzen. Die aktuellen regenerativen Therapieoptionen sind jedoch bislang nicht in der Lage, die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels aufzubauen. Daher wird ein tieferes Wissen über die Einflussfaktoren auf die Mechanokompetenz des Knorpels benötigt, um vorhandene Therapieoptionen zu verbessern oder neue Therapien zu etablieren.

1.7 Zielsetzung

Klinische Methoden zur Knorpelreparatur können zum derzeitigen Stand keinen hyalinen Knorpel regenerieren und resultieren vorwiegend in der Bildung von Faserknorpel. Die biomechanischen Eigenschaften dieses Ersatzgewebes sind denen des hyalinen Knorpels unterlegen und können den physiologischen mechanischen Belastungen im Gelenk oft nicht standhalten. Gelenkprothesen zeigen zwar eine hohe mechanische Widerstandskraft, bieten jedoch keine Anpassungen an die physikalischen Bedingungen, die sich z.B. beim Altern ändern können. Vitales Knorpelersatzgewebe hingegen hat diese Anpassungsmöglichkeiten, es muss jedoch sichergestellt werden, dass das Regenerationsgewebe eine knorpeltypische Mechanokompetenz erwirbt, um die Knorpelhomöostase gewährleisten zu können. Das heißt, die Mechanokopplung im Gewebe, die Mechanotransduktion der Reize ins Zellinnere und ihre Übersetzung in intrazelluläre Signale, sowie die Mechanoadaptierung sollten denen von nativem Knorpelgewebe entsprechen. Die Qualität von Knorpelersatzgewebe wird derzeit vorwiegend auf Gewebeebene anhand der Ablagerung knorpeltypischer EZM-Moleküle und auf Zellebene anhand der Expression chondrogener Marker bewertet, nicht aber anhand seiner Mechanokompetenz und somit seiner biologischen Funktionalität. Ob mesenchymale Vorläuferzellen wie MSC, die bei der Mikrofrakturierung oder bei Knorpel TE Ansätzen zum Einsatz kommen, im Laufe ihrer Ausreifung zu Chondrozyten dem Ersatzgewebe dieselbe knorpeltypische Mechanokompetenz verleihen können wie AC, ist derzeit ebenfalls unklar.

Ziel dieser Studie ist es, funktionale Aspekte von Knorpelersatzgewebe in den Mittelpunkt zu stellen und die Mechanokompetenz von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe mit der von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu vergleichen. Dabei kann insbesondere ein besseres Verständnis der Mechanotransduktion und der für die Mechanoadaptierung der Zellen relevanten Signalwege in MSC- und AC-basierten Knorpelreparaturstrategien dazu dienen, pharmakologische Behandlungen zu erwägen und TE Ansätze zu verbessern.

Ansatz dieser Arbeit war es, die rein physikalisch bedingte, durch GAG-Ablagerung und Härte determinierte Mechanokopplung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe konstant zu halten, um eine vergleichende Analyse von Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung unter einem für AC physiologischen Belastungsprotokoll zu ermöglichen. Die Mechanotransduktion wurde anhand der Integrinexpression, der Aktivierung des Mechanotransduktionswegs pERK1/2 und der Expression mechanosensitiver Gene und miRs untersucht. Die Mechanoadaptierung wurde anhand der Anpassungen der EZM-Synthese, anaboler und kataboler Signalkaskaden, sowie für MSC-basierte Chondrozyten über mögliche Veränderungen des Zellphänotyps beurteilt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Feinchemikalien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, mit dem Reinheitsgrad p.A. von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck und Carl Roth bezogen.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
ABsolute QPCR SYBR Green Mix, 2x	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Alizarin rot S	Chroma (Münster)
Ammoniumpersulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aquatex	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Borsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bouin's Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Chondroitin-6-sulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Complete Mini Tabletten (Protease Inhibitor)	Roche Applied Science (Basel, CH)
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Certistain Fast Green FCF	Merck (Darmstadt)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ficoll Paque Plus	Cytiva (Schweden)
Gelatine	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (100ng/ μL)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämalaun nach Mayer (sauer)	Chroma (Münster)
ImmPact Vector Red Substrate Kit	Vector Laboratories (USA)
Indomethacin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	AppliChem (Darmstadt)
Lithium Chlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Applied Science (Basel, CH)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronlauge (NaOH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Neo-Mount	Merck (Darmstadt)
Non-essential amino acids	Gibco/Life Technologies
Oligo(dT) 16 Primer	Eurofins Genomics (Ebersberg)
Ölrot Orange (Ölrot O)	Chroma (Münster)
Paraffin Paraplast X-Tra®	Leica Biosystems (Nussloch)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Pefabloc®	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin/Streptomycin [100 U/ml]	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad)
peqGOLD TriFast	PeqLab/VWR (Erlangen)
peqGreen DNA/RNA Farbstoff	PeqLab/VWR (Erlangen)
PhosphoSafe™ Extraktionsreagenz	Merck (Darmstadt)
Ponceau Rot S	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Precision Plus Protein Standards™ Dual Color Primer	Bio-Rad (Hercules, USA)
L-Prolin	Eurofins MWG Operon (Huntsville, USA)
Restore™ PLUS Stripping Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNaseOut™ Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Roti® Histol	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rotiphorese® 30 Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Safranin Orange (Safranin O, Saf. O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Chroma (Münster)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tisseel (Fibrinogen, Thrombin)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Transferrin human	Baxter (Unterschleißheim)
Trifast	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris Base	VWR (Erlangen)
Tris-HCl	Merck (Darmstadt)
Trizol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau (0,4%)	ambion/Life Technologies (Carlsbad)
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Türksche Lösung	Biochrom/Merck (Darmstadt)
Tween® 20	Merck (Darmstadt)
UltraPure destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
WesternBright Chemilumineszenz Substrat	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad)
	Advansta (Menlo Park, USA)

2.2 Radioaktive Isotope

Bezeichnung

[³H]-Prolin
[³⁵S]-Sulfat

Hersteller

Hartmann Analytics (Braunschweig)
Hartmann Analytics (Braunschweig)

2.3 Wachstumsfaktoren und Enzyme

Bezeichnung

BMP6 rekombinant human
FGF-2 rekombinant human
Hyaluronidase aus Rindertestis 750-3.000 U/mg
Insulin glARGine 100 U/mL
IL1-β rekombinant human
ITS+ Premix
Kollagenase B aus *C. histolyticum* >0,15 U/mg
Omniscrypt Reverse Transkriptase
Pronase
Proteinase K rekombinant >600 U/mL
RNaseOUT™ >80.000 U/mg

Hersteller

R&D Systems (Minneapolis, USA)
Active Bioscience (Hamburg)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sanofi-Aventis (Frankfurt am Main)
Promokine (Heidelberg)
Corning Life Sciences (New York, USA)
Roche Applied Science (Basel, CH)
Qiagen (Hilden)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad)

Materialien

TaqMan® Universal PCR Master Mix
TGF-β1 rekombinant human

10x Trypsin/EDTA

Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Peprotech (Hamburg), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), Biomol (Hamburg)
Merck (Darmstadt)

2.4 Agonisten und Inhibitoren

Bezeichnung

Bay11-7082
Dibutyryl-caMP
Forskolin
H89
IBMX
LDN212854
MDL-12,330A
PTHrP(1-34)
PTHrP(7-34)

Hersteller

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bachem (Schweiz)
Bachem (Schweiz)

2.5 Antikörper

2.5.1 Durchflusszytometrie

Bezeichnung

Anti-human CD34-Phycoerythrin (PE) aus Maus
Anti-human CD45-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) aus Maus
Anti-human CD73-PE aus Maus
Anti-human CD90-FITC aus Maus
Anti-human CD105-PE aus Maus

Hersteller

BD Pharmingen (Heidelberg)
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
BD Pharmingen (Heidelberg)
BD Pharmingen (Heidelberg)
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.5.2 Histologie

Bezeichnung

Anti-human Kollagen Typ II (II-4CII) aus Maus, monoklonal, Cat. 8631712
BrightVision Poly-AP-Anti Ms/Rb/Ra aus Ziege, Cat. DPVO55AP

Hersteller

MP Biomedicals (Santa Ana, USA)
Immunologic, Duiven (NL)

2.5.3 Western Blot

Bezeichnung

Anti-human SOX9 aus Kaninchen, polyklonal, Cat. Ab5535, 1:2000
Anti-human Phospho-ERK (E-4) aus Maus, monoklonal, Cat. SC-7383, 1:200
Anti-human p44/42 MAPK (ERK1/2) aus Kaninchen, polyklonal, Cat. 9102, 1:1000
Anti-human β-Aktin (AC-15) aus Maus, monoklonal, Cat. GTX26276, 1:10000
Anti-human Phospho-SMAD1/5/9 aus Kaninchen, monoklonal, Cat. 13820, 1:250
Anti-human SMAD1 aus Kaninchen, monoklonal, Cat. Ab33902, 1:250
Anti-human SMAD5 aus Kaninchen, monoklonal, Cat. Ab40771, 1:500
Anti-human pSMAD2 aus Kaninchen, monoklonal, Cat. 3108, 1:250

Hersteller

Merck (Darmstadt)
Santa Cruz Biotech. (Dallas, USA)
Cell Signaling (Danvers, USA)
GeneTex (Irvine, USA)
Cell Signaling (Danvers, USA)
abcam (Berlin)
abcam (Berlin)
Cell Signaling (Danvers, USA)

Anti-human SMAD2/3 aus Kaninchen, monoklonal, Cat. 8685, 1:250	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-human BSPII (IBSP, LFMb-24) aus Maus, monoklonal, Cat. Sc-73634, 1:500	Santa Cruz Biotech. (Dallas, USA)
Anti-human cRel aus Ziege, polyklonal, Cat. PA5-47370, 1:400	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-human p65 (aktiv, 12H11) aus Maus, monoklonal, Cat. MAB3026, 1:500	Merck (Darmstadt)
Anti-human p65 (D14E12) aus Kaninchen, monoklonal, Cat. 8242, 1:1000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-human p105/p50 (E381) aus Kaninchen, monoklonal, Cat. Ab32360, 1:1000	abcam (Berlin)
Anti-Kaninchen HRP aus Ziege, polyklonal, Cat. 111-035-046, 1:10000	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)
Anti-Maus HRP aus Ziege, polyklonal, Cat. 115-035-071, 1:5000	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)
Anti-Ziege HRP aus Rind, polyklonal, Cat. 805-035-180, 1:5000	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)

2.6 Kits

Bezeichnung

cAMP Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
(ELISA) Kit
Dynabeads mRNA Purification Kit
miRNeasy Mini Kit
Omniscrypt RT Kit (Desoxyribonukleosidtriphos-
phate (dNTP) Mix 5 mM, RT Puffer 10x)
PGE₂ ELISA Kit
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit
Zymoclean™ GEL DNA Recovery Kit

Hersteller

Enzo Life Sciences (Lörrach)
Invitrogen/Life Technol. (Carlsbad, USA)
Qiagen (Hilden)

Qiagen (Hilden)
Enzo Life Sciences (Lörrach)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Applied Biosystems/Life Technologies
(Carlsbad, USA)
Zymo Research (Irvine, USA)

2.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

Adhäsions-Objektträger SuperFrost Ultra Plus™
β-Trikalziumphosphat (β-TCP) 70% Porosität,
4x4x11 mm
Biopsie-Stanzen 4 mm rund
Borosilikatglasträger VitraPOR-Spezial-Filter-
platte Por.2, 36 % Porosität, 4x4x6 mm
Einfrierbehälter
Einmalskalpelle
Einweg-Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
Filterpapier Whatman 3mm
Flachbodenplatte 24-, 48- und 96-well
Flachbodenplatte 96-well schwarz
Kryoröhrchen
Laborhandschuhe
LightCycler 8-Tube Streifen
LightCycler 96-Well Platte
Mikrotomklingen A35, N35
Nitrocellulose Membran Amersham Hybond ECL
Nylonsieb (40 µm)
Optimaix (dreidimensionaler) 3D Kollagenschwamm

Hersteller

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

RMS Foundation (Bettlach, CH)
Stiefel (Brentford, UK)

ROBU Glasfilter-Geräte GmbH (Hattert)
Nalgene (Waltham, USA)
Feather (Osaka, JP)
Becton Dickinson (Heidelberg)
GE Healthcare (Chalfont St Giles, USA)
Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Simport (Saint-Mathieu-de-Beloeil, CA)
Peha-Soft Hartmann (Heidenheim)
Roche Applied Science (Basel, CH)
Roche Applied Science (Basel, CH)
Feather (Osaka, JP)
GE Healthcare (Chalfont St Giles, USA)
BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Matricel (Herzogenrath)

Materialien

Parafilm M	Pechiney Plastic Pack. (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Pipettenspitzen, RNase-frei	Eppendorf (Hamburg)
Polytronröhrchen	Greiner bio-one (Kremsmünster, AT)
Präparatebox (Mediumschalen für Bioreaktor)	Reichert Chemietechnik (Heidelberg)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Reaktionsgefäße, RNase-frei (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Skalpell	Feather (Osaka, JP)
Steritop Express™ Plus (0,22 µm)	Merck (Darmstadt)
Szintillationsröhrchen	neolab (Heidelberg)
Wälzlager KWEM9-G2/A_V1 und Schiene	Schaeffler (Herzogenaurach)
Zellkulturflaschen Cellstar T25, T75, T175	Nunc (Wiesbaden)

2.8 PCR-Primer

Gen-name	Forward Sequenz 5' – 3'	Reverse Sequenz 5' – 3'	T [°C]
<i>ACAN</i>	GCACATGCCTTCTGCTT	GGAACCACTTGGGTCACG	58
<i>ALPL</i>	CACCAACGTGGCTAAGAATG	ATCTCCAGCCTGGTCTCCTC	58
<i>AXUD1</i>	TGGCTGTACTCTGGGTATGG	GGTAGGGCTGTAGGAAGCTC	60
<i>BMP2</i>	ACGAGGTCCTGAGCGAGTTC	GAAGCTCTGCTGAGGTGATAA	58
<i>BMP6</i>	ATTACAACAGCAGTGAATTGA	TTCATGTGTGCGTTGAGTG	58
<i>CHSY1</i>	GTCTGGTCTTATGAGATGCAGCAG	ATCTTGCGGCTCAGCATGTA	60
<i>COL2A1</i>	TGGCCTGAGACAGCATGAC	AGTGTTGGGAGCCAGATTGT	58
<i>COL10A1</i>	TTTACGCTGAACGATACCAA	TTGCTCTCCTCTTACTGCTAT	58
<i>COMP</i>	CACTGACCTAGACGGCTTC	ATCAAAGTCGTCTGGCACA	58
<i>COX2</i>	TTCAAATGAGATTGTGGAAAAATTGCT	AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT	58
<i>CPSF6</i>	AAGATTGCCTTCATGGAATTGAG	TCGTGATCTACTATGGTCCCTCTCT	58
<i>DUSP5</i>	CTCCCACTTTCAAGAAGCAA	GGCAGGATCTCAGATTCGTA	60
<i>FOS</i>	TCCAGTGCCAACCTTCATTCC	GCTGCAGCCATCTTATTCT	60
<i>FOSB</i>	CCAGGGAAATGTTTCAGGCT	GAAGAGATGAGGGTGGGTTG	60
<i>HNRPH1</i>	GATGTAGCAAGGAAGAAATTGTTTCAG	CACCGGCAATGTTATCCCAT	58
<i>IBSP</i>	CAGGGCAGTAGTACTCATCC	TCGATTCTTCATTGTTTTCTCCT	59
<i>IHH</i>	CGACCGCAATAAGTATGGAC	GGTGAGCGGGTGTGAGTG	60
<i>ITGA10</i>	TCTCTAGAAACCTCCACCTGG	CTGGAAGGAGGGCTGAGATGATGA	61
<i>ITGA11</i>	ACAGGGATGTGTTCAAGAGTCA	GGATGTTGATGAGGAAGTGCT	58
<i>ITGA5</i>	AGATGCCCTACCGAATCCTG	AGATGAGTAGACCTAGGAGCAG	60
<i>MEF2C</i>	GTATGGCAATCCCCGAAACT	ATCGTATTCTTGCTGCCTGG	58
<i>NR4A2</i>	GGGCTGCAAAGGCTTCTTTA	TGTGCGAACCCTTCTTTGA	60
<i>PTHR1</i>	GGTGAGGTGGTGGCTGT	AGCATGAAGGACAGGAAC	58
<i>PTHLH</i>	CGGTGTTCTGCTGAGCTA	TGCGATCAGATGGTGAAGGA	58
<i>SOX9</i>	GTACCCGCACTTGACAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	60

2.9 TaqMan® MicroRNA Assays

Assay Name	Sequenz	MiRBase
U6 snRNA	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACG ATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGA CACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT	
hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	0000278
hsa-miR-6723-5p	AUAGUCCGAGUAACGUCGGGGC	0025855
hsa-miR-6872-3p	CCCAUGCCUCCUGCCGCGGUC	0027645

2.10 Puffer und Lösungen

Alle einfach konzentrierten Gebrauchslösungen wurden durch eine entsprechende Verdünnung der konzentrierten Stammlösungen mit Reinstwasser hergestellt.

2.10.1 Allgemeine Puffer

Phosphate-Buffered Saline (PBS) (10x)

1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 101,4 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄. 1x PBS pH 7,4 wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit Reinstwasser im Verhältnis 1:10 hergestellt, für 1x PBS pH 5,5 wurde außerdem HCl 32 % zugesetzt.

Tris-Buffered Saline (TBS) (10x)

250 mM Tris-HCl, 1,45 M NaCl, 27 mM KCl. pH 7,6 wurde mit HCl 32 % eingestellt. Die einfach konzentrierte Gebrauchslösung wurde durch Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 hergestellt und der pH-Wert mit HCl 32 % auf pH 7,5 eingestellt. TBS-T Bestehend aus 1x TBS pH 7,5 mit 0,05 % (v/v) Tween 20.

Tris-HCl

Alle Tris-HCl Lösungen wurden durch Ansetzen einer Tris Base-Lösung in der gewünschten Molarität und anschließender Einstellung des geforderten pH-Wertes mit HCl 32 % oder 1 M HCl hergestellt.

2.10.2 Zellkultur

Trypsin-EDTA-Lösung

10x Trypsin-EDTA 1:10 in Reinstwasser

Protease Inhibitor-Lösung

1 Complete Mini Tablette in 1,5 ml PBS sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

2.10.3 Histologische Analysen

2.10.3.1 Fixierlösung

Bouin's Lösung (gebrauchsfertige Lösung)

Enthält gesättigte Pikrinsäure, Formaldehyd und Essigsäure

2.10.3.2 Färbelösungen

Ölrot O-Lösung

0,5 % Gebrauchslösung wurde durch Verdünnung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) aus einer Stammlösung aus 5 % (w/v) Ölrot O in 99 % Isopropanol erstellt.

Alizarin Rot S-Lösung

5 g/L Alizarin Rot S in Aqua dest.

Safranin O-Lösung

Safranin O 0,2 % (w/v) in Essigsäure 1 % (v/v) in Aqua dest.

Fast Green-Lösung

Fast Green 0,04 % (w/v) in Essigsäure 0,2 % (v/v) in Aqua dest.

2.10.3.3 Lösungen für Immunhistochemie

PBS pH 5,5

137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,14 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄ pH 5,5 in Reinstwasser

Blockierungslösung

BSA 5 % (w/v) in PBS

2.11 Molekularbiologische Analysen

2.11.1 Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

242 g/l TrisBase, 57,1 g/l Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8

Agarosegel (1,5 %)

Agarose 1,5 % (w/v), peqGreen 3 µL pro 100 ml in TAE-Puffer

2.11.2 mRNA-Isolation aus Pellets

Waschpuffer B

0,15 M LiCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl in RNase-freiem Wasser, pH 7,5

2x Bindungspuffer

1 M LiCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl in RNase-freiem Wasser, pH 7,5

2.12 Biochemische Analysen

2.12.1 Glykosaminoglykanmessung

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, pH 8 in Aqua dest.

DMMB-Färbelösung für Knorpelersatzgewebe

3,04 g/l Glycin, 2,38 g/l NaCl, 20 mg/l DMMB, pH 3 in Aqua dest., im Dunkeln lagern, ca. 3 Monate haltbar

Proteinase K-Puffer

50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ in Aqua dest., pH 8

2.12.2 SDS-PAGE

Sammelgel (5 %)

16,4 % (v/v) Rotiphorese 30, 150 mM TrisHCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,08 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,08 % (v/v) TEMED in Aqua dest.

Trenngel (10 %)

33 % (v/v) Rotiphorese 30, 374 mM TrisHCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,04 % (v/v) TEMED in Aqua dest.

Lämmli-Puffer (4x)

249 mM TrisHCl pH 6,8, 33,2 % (w/v) Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau in Aqua dest. Vor Gebrauch 1:10 mit β-Mercaptoethanol verdünnt eingesetzt

SDS-Laufpuffer (10x)

248 mM TrisBase, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS in Aqua dest., 1x Laufpuffer bis zu 2x verwendbar

2.12.3 Western Blot

Transferpuffer für Wet Blot

0,125 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) Methanol, 239,8 mM Glycin, 31,4 mM TrisBase in Aqua dest., auf 4°C gekühlt verwendet, bis zu 2x verwendbar

10x TBE-Puffer für Semi-Dry Blot

10,8 % (w/v) Tris, 5,5 % (w/v) Borsäure, 2 % (v/v) 0,5 M EDTA (pH 8) in Aqua dest. Für Semi-Dry Blot 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween20 in TBS

Blockierungslösung/Milch

Magermilchpulver 5 % (w/v) in TBS-T

Coomassie-Färbelösung

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in Aqua dest.

Coomassie-Entfärbelösung

25 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure in Aqua dest.

2.13 Zellkulturmedien

Anlösen von Wachstumsfaktoren, Agonisten und Antagonisten

5 µg TGF-β1 wurden in 100 µL 10 mM Zitronensäure, pH 3,0, gelöst, und anschließend mit 400 µL PBS auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. 50 µg FGF-2 wurden in 500 µL 1 % BSA in PBS gelöst und mit Aqua dest. auf eine Endkonzentration von 10 µg/mL verdünnt. Kollagenase B und Hyaluronidase wurden in PBS aufgenommen. BMP6 wurde in PBS mit 4 mM HCl und 0,1 % BSA gelöst und auf eine Endkonzentration von 100 ng/µL gebracht. LDN212854 wurde als 1 mg/mL Stammlösung in DMSO verwendet. IL-1β wurde in 1 % BSA in PBS als 10 µg/mL Stammlösung angelöst. Stammlösungen von 100 mM Bay11-7082, 1 M IBMX, 10 mM Forskolin, 10 mM H89 und 100 mM MDL-12,330A wurden durch Lösen in DMSO erstellt. 10 µg/mL PTHrP(1-34), 0,1 M dbcAMP und 1 mM PTHrP(7-34) wurden durch Lösen in Aqua dest. hergestellt. Alle Enzyme, Wachstumsfaktoren, Agonisten und Antagonisten wurden nach dem Lösen aliquotiert und bei -20°C oder -80°C gelagert.

Expansionsmedium für Chondrozyten

DMEM Basismedium mit Glukose (1,5 g/l), L- Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies (Carlsbad, USA), Art. 31885), 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Expansionsmedium für MSC (ES-Medium)

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/L), L-Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies (Carlsbad, USA), Art. 41966), 12,5 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, Non-essential amino acids, 50 µM 2-Mercaptoethanol. Der Mediumzusatz 4 ng/mL FGF-2 wurde vor Gebrauch frisch hinzugegeben und das Medium anschließend nicht länger als sieben Tage verwendet (Lagerung bei 4°C).

Chondrogenes Induktionsmedium

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/l), L- Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies (Carlsbad, USA), Art. 41966), 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit, 1,25 mg/ml BSA, 0,1 µM Dexamethason, 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat, zusätzlich 1 mM Natriumpyruvat (Endkonzentration 2 mM), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,35 mM L-Prolin, 10 ng/ml TGF-β, 5 µg/ml Insulin. Medienzusätze TGF-β und Insulin wurden vor Gebrauch frisch zugegeben und das Medium anschließend nicht länger als sieben Tage verwendet (Lagerung bei 4°C). Für MSC wurden Insulin, Transferrin, Natriumselenit und BSA durch ITS+ Premix ersetzt.

Adipogenes Induktionsmedium

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/L), L-Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies (Carlsbad, USA), Art. 41966), 10% FBS (Sigma), 1 µM Dexamethason (Sigma), 0,2 mM Indomethacin, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma), 1 % Penicillin/Streptomycin Insulin wurde vor Gebrauch frisch zugegeben und das Medium anschließend nicht länger als sieben Tage verwendet.

Osteogenes Induktionsmedium

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/L), L- Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies (Carlsbad, USA), Art. 41966), 10% FBS (Sigma), 0.1 µM Dexamethason (Sigma), 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat (A2P, Sigma), 10 mM β-Glycerophosphat, 1 % Penicillin/Streptomycin

Einfrriermedium

40 % (v/v) Expansionsmedium, 50 % (v/v) FBS, 10 % (v/v) DMSO

2.14 Geräte

Bezeichnung

Agarosegel-Belichtungskammer
Agarosegelelektrophorese Kammer

Hersteller

PEQLAB/VWR (Erlangen)
Bio-Rad (Hercules, USA)

Materialien

Brutschrank BB5060 (Bioreaktor)	Heraeus (Hanau)
Digi Test II	Bareiss (Oberdischingen)
DNA/RNA UV Cleaner Hood	Kisker Biotech (Steinfurt)
Edelstahlkugeln 5 mm für Proteinisolierung	Retsch (Haan)
Gießstationen für SDS-Gele	Bio-Rad (Hercules, USA)
Heizplatte für Paraffinschnitte	Medax (Neumünster)
LightCycler 96	Roche Applied Science (Basel, CH)
Mikroskop Axioplan2 Imaging + AxioCam HRC	Zeiss (Oberkochen)
Motion Controller FMC 400 (Bioreaktor)	Steinmeyer Mechantronik (Dresden)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht (Sondheim vor der Rhön)
Omega FLUOstar Luminometer	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg)
pH Meter PB-11, pH Elektrode PY-P11	Sartorius (Göttingen)
Polytron PT MR2100	Kinematika (Luzern, CH)
Schlittenmikrotom Jung Histoslides 2000R	Leica (Wetzlar)
Schwingmühle MM 400	Retsch (Haan)
Schwingenspule VM5050-250 (Bioreaktor)	Geeplus (Beckenham, UK)
SDS-PAGE Mini Protean II	Bio-Rad (Hercules, USA)
SDS-PAGE Short und Spacer-Platten 1,5 mm	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sensor Feinprüf 1300	Mahr (Göttingen)
Sunrise Magellan Mikroplattenleser	Tecan (Männedorf, CH)
Wallac MicroBeta-Zähler	PerkinElmer Life Sciences (Waltham, USA)
Wallac 1420 Victor2 Mikroplattenleser	PerkinElmer Life Sciences (Waltham, USA)
Wärmeofen für Knorpelverdau Hybrid 2000	H. Saur (Reutlingen)
Western Blot Belichtungskammer Fusion-SL 3500-WL	PEQLAB/VWR (Erlangen)
Western Blot Mini Trans-Blott Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Zentrifuge Rotina 420	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 320	Hettich (Tuttlingen)
Zellkulturbank HeraSafe	Heraeus Instruments

2.15 Software

Bezeichnung

AxioVision Rel 4.6.3.0
Bio-1D
BioCapt 11.02
Endnote™ X9
Fusion Molecular Imaging
GalilTools 1.6.4.550
GraphPad Prism 5
Hardtest V2.0
LightCycler® 96 Software
MACQuantify Version 2.11.1746.19438
Magellan 6.6
MS Office
ND-1000 V3.8.1
Omega Control
Photoshop 7.0.1
SPSS Statistics 25
Wallac 1420 Manager

Hersteller

Zeiss (Oberkochen)
Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Clarivate (Philadelphia, USA)
Vilber Lourmar (Eberhardzell)
Galil (Rocklin, USA)
GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Bareiss (Oberdischingen)
Roche Applied Science (Basel, Schweiz)
Miltenyi Biotec
Tecan (Männedorf, Schweiz)
Microsoft (Redmont, USA)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
BMG LABTECH GmbH (Ortenberg)
Adobe Systems (San José, USA)
IBM (Armonk, USA)
PerkinElmer Life Sciences (Waltham, USA)

3 Methoden

3.1 Rechtliche und ethische Aspekte der Studie

Die vorliegende zellbiologische Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung durchgeführt. Vor Studienbeginn wurden die Teilnehmenden mündlich und schriftlich über Wesen und Tragweite der geplanten Untersuchung und über möglichen Nutzen und eventuelle Risiken für ihre Gesundheit aufgeklärt. Die Teilnahme der Patient*innen erfolgte freiwillig und bedurfte der schriftlichen Zustimmung mit dem Recht, jederzeit unter Vernichtung des Probenmaterials und bereits gewonnener Daten von der Studie zurücktreten zu können. Vorschriften der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes wurden im Rahmen der Studie eingehalten. Das Studienkonzept wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg begutachtet und bewilligt (Nummer S-028/2014 und S-609/2019).

3.2 Gewebeisolation, Zellgewinnung und Expansion

3.2.1 Gelatinebeschichtung von Zellkulturflaschen

Zur Expansion von MSC wurden die Zellkulturflaschen zuvor mit einer 0,1 % Gelatinelösung in PBS beschichtet. Dazu wurde die Gelatine steril abgewogen und in sterilem PBS für zwei min in der Mikrowelle aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen der Gelatinelösung auf etwa 60°C wurde der Flaschenboden von T75 oder T175 Zellkulturflaschen mithilfe einer sterilen Stabpipette mit 5-10 mL Gelatinelösung benetzt und bei 37°C, 6 % CO₂ für 30 min bis max. 14 Tage aufbewahrt.

3.2.2 MSC Isolation aus Knochenmarkaspiraten

MSC wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Heidelberg und der Spender*innen aus Knochenmarkaspiraten von 47 Patient*innen isoliert, bei denen eine Hüftendoprothese eingesetzt wurde. Das Alter der Patient*innen lag zwischen 24 und 92 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 62 ± 17 Jahren (28 weiblich, 19 männlich).

Das Knochenmarkaspirat wurde zunächst von der Entnahmespritze in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 30 mL sterilem PBS und anschließender Zentrifugation (10 min, 650 x g) gewaschen. Anschließend wurde eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation mittels Ficoll Paque Plus durchgeführt. Bei der Dichte-Gradienten-Zentrifugation werden die verschiedenen Zelltypen anhand ihrer Dichte aufgetrennt; die kernlosen Erythrozyten aggregieren am Boden des Reaktionsgefäßes, in der darüber liegenden Phase befinden sich hauptsächlich Granulozyten, während MSC sich in der mononukleären Phase in der Interphase zwischen Ficoll Paque Plus und PBS anreichern und einen sichtbaren Zellring bilden. Das Knochenmark wurde dazu in 15-20 mL sterilem PBS aufgenommen und vorsichtig auf 15 mL Ficoll Paque

Plus geschichtet und 35 min bei 1460 x g unter Deaktivierung der Bremsfunktion zentrifugiert. Der Zellring wurde mithilfe einer 10 mL Stabpipette abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen und bei absteigender Rotationszahl (650, 450, 290 x g) für je 10 min zentrifugiert. Mithilfe einer Neubauerzählkammer wurde die Zahl der isolierten Zellen unter Verwendung von Türkscher Lösung im Verhältnis 1:5 bis 1:50 gezählt. Die Türksche Lösung verursacht eine Lyse der in der Zellsuspension noch vorhandenen Erythrozyten. Es wurden 125.000-150.000 Zellen pro Quadratcentimeter in gelatinisierte Zellkulturflaschen mit ES-Medium ausgesiedelt. Nach einem Tag wurden nicht adhärenente hämatopoetische Zellen durch einmaliges Spülen der Flaschen mit PBS entfernt. Die adhärenenten Zellen bildeten sogenannte „Spots“, die nach Erreichen von ca. 70-80 % Konfluenz mithilfe von Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst und im Folgenden mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² ausgelegt wurden. Ab Passage 1 zeigten die Zellen eine homogene Verteilung. Nach maximal drei Passagen wurden sie für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

3.2.3 Native Knorpelbiopsien und Isolierung humaner Chondrozyten

OA-Knorpelproben wurden aus makroskopisch intakten knorpeligen Bereichen von Knorpel- und Knochenresektaten von Patient*innen, bei denen eine Knieendoprothese-Operation durchgeführt wurde, gewonnen.

Zum Vergleich der Härte zwischen nativem Knorpel und dem *in vitro* generierten Knorpelersatzgewebe wurden zylinderförmige Vollschicht-Knorpelbiopsien mit einem Durchmesser von 4 mm mittels Biopsiestanze aus makroskopisch gesunden Knorpelarealen von osteochondralen Bruchstücken herausgelöst und einer Härtemessung unterzogen (siehe Kapitel 3.6).

Die Isolation humaner primärer Chondrozyten erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Heidelberg und der Spender aus makroskopisch intaktem Knorpel des Tibiaplateaus und der Femurkondylen von insgesamt 19 OA-Patient*innen, die eine Knieendoprothese erhielten. Das Alter der Patient*innen lag zwischen 49 und 87 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 68 ± 11 Jahren (15 weiblich, 4 männlich).

Mithilfe eines Skalpell wurde hyaliner Knorpel unter Zurücklassen der kalzifizierten Bereiche vorsichtig vom subchondralen Knochen getrennt und zerkleinert. Dabei blieb der Knorpel permanent mit sterilem PBS benetzt. Die Gesamtmenge des abgetragenen Knorpels wurde gewogen und in einem Verdauansatz (10 mL/g Knorpel) bestehend aus 1,5 mg/ml Kollagenase B und 100 µg/ml Hyaluronidase in Chondrozyten-Expansionsmedium in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Der Verdauansatz wurde über Nacht für 16-20 h bei 37°C unter permanenter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Chondrozyten durch Filtrieren (40 µm Nylonsieb) vom unverdauten Gewebe separiert und die Zellen aus dem Filtrat bei 300 x g 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml PBS gewaschen und 10 µL der Zellsuspension wurden mit 0,4 % Trypanblau gemischt, um die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zu ermitteln. Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in 25 ml Chondrozyten-

Expansionsmedium in einer Dichte von 5700 Zellen pro cm^2 in T175 Zellkulturflaschen ausgelegt und bei 37°C und 6 % CO_2 kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurden Zelltrümmer und Geweberückstände durch Waschen mit PBS entfernt. Bei etwa 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert (Kapitel 3.2.4) und nach Passage 2 für die Versuchsreihen verwendet. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

3.2.4 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, wurden sie durch enzymatische Aufspaltung ihrer Adhäsionsmoleküle vom Untergrund gelöst. Dazu wurde das Expansionsmediums zunächst entfernt, der Zellrasen zweimal mit sterilem PBS gespült und für 5-10 min bei 37°C und 6 % CO_2 mit Trypsin-EDTA (2 mL für T75, 4 mL für T175) behandelt. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Expansionsmedium gestoppt und die Zellsuspension in einem 50 mL Reaktionsgefäß bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und die Lebendzellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer und 0,4 % Trypanblau-Lösung ermittelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen entweder in Expansionsmedium in Zellkulturflaschen ausgelegt oder für Versuchsreihen in chondrogener 3D-Kultur eingesetzt.

3.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Chondrozyten wurden nach Passage 0-1, MSC nach Passage 1-2 eingefroren. Hierzu wurden die Zellen, nachdem sie mittels Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturflaschenboden gelöst (Kapitel 3.2.4) wurden, in sterilem PBS gewaschen und unter Zuhilfenahme einer Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden anschließend in einer 4°C kalten Einfriermedium (Kapitel 2.12) in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-gefüllten Gefrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.6 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und die aufgetaute Zellsuspension sofort im Verhältnis 1:10 in Expansionsmedium in einem 50 mL Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach Zentrifugation bei $300 \times g$ für 10 min wurde das Zellpellet in 10 ml Expansionsmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Humane Chondrozyten oder humane MSC wurden in T175 Zellkulturflaschen ausgelegt und in 25 ml des jeweiligen Expansionsmediums expandiert.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und chemische Eigenschaften von Zellpopulationen analysiert werden. Zellsuspensionen werden dabei in das Durchflusszytometer injiziert und so fokussiert, dass zeitgleich nur eine einzige Zelle durch einen Laserstrahl geleitet wird. Die Lichtstreuung gibt Merkmale der Zellen wieder. Des Weiteren können Oberflächenproteine auf Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. Um Oberflächenantigene der Zellen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, wurden die Zellen trypsiniert und 2×10^5 Zellen in 200 μL PBS und 4 % FBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit anti-CD105, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD34 oder anti-CD45 in 1:40 Verdünnung für 30 min bei 4°C inkubiert und nach zweimaligem Waschen in PBS + 4 % FBS bei 200 x g im MACSQuant Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software MACSQuantify Version 2.11.1746.19438 (Miltenyi Biotec) analysiert.

3.2.8 Differenzierung von MSC in die adipogene und osteogene Linie

MSC besitzen das Potenzial, in die adipogene, osteogene und chondrogene Linie zu differenzieren. Dies kann *in vitro* durch die Wahl bestimmter Wachstumsfaktoren und Medienkomponenten erreicht werden. Dazu wurden die Zellen nach Passage 3 mit je $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 24-Well-Platten gesiedelt und mit adipogenem Medium bzw. osteogenem Medium kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und die Zellen nach 1, 7, 14 und 21 Tagen fixiert. Dazu wurde das Medium zunächst abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen der adipogen-differenzierten Zellen mit 4 % PFA und der osteogen-differenzierten Zellen mit eiskaltem 70 % Ethanol fixiert und die Platten bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

3.2.9 Chondrogene Differenzierung von MSC in Pelletkultur

Die chondrogene Differenzierung von MSC wurde in einem 3D Pelletansatz durchgeführt. Dazu wurden MSC der Passage 3 mit je $0,5 \times 10^6$ Zellen in 500 μL chondrogenem Medium mit ITS+ Premix und 10 ng/mL TGF- β in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C, 6 % CO₂ bis zu 42 Tage kultiviert. Unter diesen Bedingungen aggregierten die Zellen bereits nach einem Tag. Ggf. vorhandene Satellitenpellets wurden beim Mediumswechsel entfernt. Zur Ernte wurden die Pellets mit PBS gewaschen und für histologische Analysen mit 4 % PFA fixiert. Für die RNA-Isolation wurden die Pellets nach dem Waschschrift in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3 Herstellung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

3.3.1 Zellbesiedlung von Kollagenträgern

Für die Herstellung von Knorpelersatzgewebe wurden expandierte humane AC bzw. humane MSC in sogenannte Optimaixträger besiedelt. Die Träger bestehen aus porcinen Kollagen Typ I und III Fasern, die parallel ausgerichtet sind. Diese dienen als Gerüst zur Einlagerung sekretierter Matrixmoleküle. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits eine mit der Zeit zunehmende Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagenen in Optimaixträgern für porcine (Krase et al. 2014) und humane Chondrozyten (Praxenthaler et al. 2018; Scholtes et al. 2018) nachgewiesen werden. Die Besiedlung mit Chondrozyten erfolgte nach Passage 2, die Besiedlung mit MSC wurde nach Passage 3 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, in Expansionsmedium aufgenommen und mithilfe der Neubauerkammer gezählt. Je $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20 μL verworfen und die Zellen im verbleibenden Volumen resuspendiert. Anschließend wurden 10 μL der Zellsuspension in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte für Suspensionszellen in einem Tropfen vorgelegt und ein zylinderförmiger Optimaix-Kollagenträger (\varnothing 4 mm x 1,5 mm) darauf platziert. Die restlichen 10 μL der Zellsuspension wurden dann auf die Oberseite des Trägers pipettiert. Um eine erfolgreiche Adhäsion der Zellen am Trägermaterial zu gewährleisten, wurden die besiedelten Träger für 2 Stunden bei 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Nach 40 min wurden die Träger mit einer Pinzette gewendet, um eine gleichmäßige Anlagerung der Zellen zu begünstigen. Die zellbesiedelten Optimaixträger wurden nach 2 Stunden mit 1,5 ml TGF- β -haltigem chondrogenem Medium für 2 Tage bei 37°C und 6 % CO_2 kultiviert, bevor sie mit dem subchondralen Knochenersatzmaterial β -TCP oder Borosilikatglas kombiniert wurden.

3.3.2 Herstellung von osteochondralem Ersatzgewebe mittels Tissue Engineering

An Tag zwei der chondrogenen Induktion wurden die zellbesiedelten Optimaixträger mit einem β -TCP- (RMS Foundation, Bettlach, CH) oder Borosilikatglasblock (ROBU Glasfilter-Geräte GmbH, Hattert) verbunden, um zweiphasiges, osteochondrales Ersatzgewebe herzustellen, damit die mechanische Belastung des Knorpelgewebes wie im Körper auf einem harten Untergrund erfolgen konnte. Dazu wurden die Blöcke kurzzeitig in Expansionsmedium inkubiert. Fibrinogen und Thrombin wurden im Verhältnis 1:15 bzw. 1:50 mit sterilem PBS verdünnt und anschließend wurden 6 μL Fibrinogen mit 3 μL Protease Inhibitor Cocktail zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß kombiniert. Die Zugabe von 6 μL verdünntem Thrombin startete die Polymerisationsreaktion. Daher wurden 6 μL des Fibrinogen/Thrombin-Gemischs zügig auf die kurze Seite des β -TCP- oder Borosilikatglasblocks pipettiert und ein zellbesiedelter Optimaixträger mittig darauf platziert. Bis zur vollständigen Polymerisation des Fibrins wurden die Proben für 20 min bei 37°C und 6 % CO_2 in einer 24-Well Platte für Suspensionszellen inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml

chondrogenem Medium pro Probe bis zum Start der mechanischen Belastung bei 37°C und 6 % CO₂ kultiviert.

3.4 Mechanische Stimulation der Knorpelersatzgewebe im Bioreaktor

Um die Reaktion MSC-basierter Chondrozyten und AC auf mechanische Belastung zu untersuchen, wurden die hergestellten Knorpelersatzgewebe nach insgesamt 21 oder 35 Tagen Vorkultivierung unter chondrogenen Bedingungen in einen spezialangefertigten Bioreaktor (Weiss et al. 2011) überführt (Abbildung 3). Dabei konnten bis max. sechs Proben parallel belastet werden. Zunächst wurden die Proben in einer Sterilwerkbank in eine feste Halterung fixiert. Zur Kompression der Proben wurde je ein Stempel pro Probe in eine bewegliche Halterung fixiert, die mithilfe einer Kugelumlaufeinheit entlang der Schiene bewegt werden konnte. Die beiden Halterungen wurden zum Einbau in den Bioreaktor schließlich so auf der Schiene fixiert, dass Stempel und Proben keinen Kontakt hatten. Der Abstand wurde so gewählt, dass eine Verschiebung der beweglichen Halterung zu einer Vorkompression der Probe von 10 % führte. Im Bioreaktor wurde die Apparatur an der beweglichen Halterung mit mobilen Stabvorrichtung verschraubt, die über das Programm Galil-Tools gesteuert wurde (Abbildung 3B). Die Fixierung der festen und beweglichen Halterung wurde gelöst und die Proben wurden über Nacht für 16-20 h vor Belastungsstart im Bioreaktor inkubiert. Dabei befanden sich je drei Proben in Mediumsschalen mit 10 ml chondrogenem Medium, für Inhibitionsexperimente wurde je eine Probe in 1,2 mL chondrogenem Medium inkubiert. Bis zur Ernte der Knorpelersatzgewebe nach Ende der Belastungsepisode erfolgte kein weiterer Mediumswechsel. Für die mechanische Kompression wurde ein dreistündiges Belastungsprotokoll verwendet (Abbildung 3A), das in früheren Studien mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 35 etabliert wurde und zu einer gesteigerten GAG-Synthese der Chondrozyten führte, so dass es als physiologisches Belastungsprotokoll bewertet wurde (Scholtes et al. 2018). Die Einstellungen wurden auf die Höhe der Proben angepasst, um eine akkurate Kompression von insgesamt 35 % der Probenhöhe (25 % zyklische Kompression plus 10 % Vorkompression) im sogenannten ‚unconfined‘ Modus, der eine seitliche Verformung der Proben erlaubte, gewährleisten zu können (Abbildung 3C, D). AC-basiertes Knorpelersatzgewebe hatte eine durchschnittliche Höhe von 1,68 mm, während MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe eine durchschnittliche Höhe von 1,32 mm hatte. Daher waren unterschiedliche Wege für die Belastung nötig und die AC-basierten Proben wurden mit dem Programm „OSZI42“ belastet, während die MSC-basierten Proben mit dem Programm „OSZI21“ belastet wurden. Die AC- und MSC-spezifischen Belastungsprotokolle sind im Anhang hinterlegt. Dabei erfolgten über drei Stunden alternierend 10-minütige statische Episoden mit 10 % Kompression sowie 10-minütige zyklische Kompressionsepisoden mit zusätzlichen 25 % Kompression sinusförmig mit einer Frequenz von 1 Hz. Sofern nicht anders angegeben wurden die Proben direkt nach Ende der dreistündigen Belastung für die nachfolgenden Analysen geerntet. Im Falle einer zeitversetzten Ernte wurde der

Stempelhalter um 1 mm von der Probe weg verschoben, so dass eine Nachkultivierung ohne Kompression unter denselben Bedingungen möglich war. Kontrollproben wurden in einem baugleichen Halter im selben Bioreaktor ohne Kompression kultiviert.

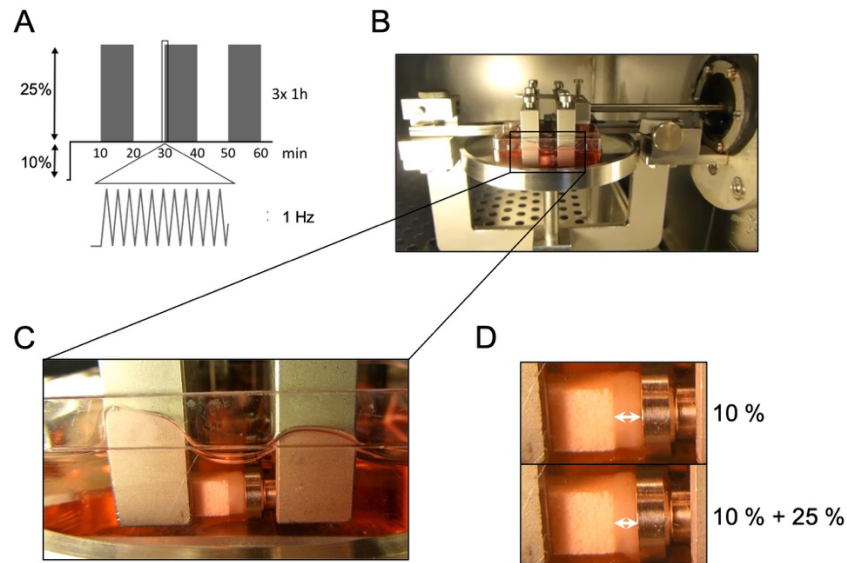


Abbildung 3. Mechanische Belastung im Bioreaktor. (A) Schematische Darstellung des dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokolls. (B) Proben-Stempel-Einheit eingebaut in den Bioreaktor. Die Mediumschälchen sind über den vertikalen Tisch positionierbar. (C) Vergrößerte Aufnahme der Proben-Stempel-Einheit im Bioreaktor. (D) Kompression des Knorpelersatzgewebes in der statischen Ausgangsphase von 10 % Vorkompression (oben) und die überlagerte Kompression von zusätzlichen 25 % (unten).

3.5 Histologische Analysen

3.5.1 Ölrot O Färbung

Ölrot O ist ein fettlöslicher Diazofarbstoff, der neutrale Triglyceride und Lipide anfärbt. Während der adipogenen Differenzierung von MSC lagern die Zellen Lipide in intrazellulären Vakuolen ab, die durch Ölrot O orange gefärbt werden können. Adipogen-differenzierte MSC wurden mit PBS gewaschen und in 4 % PFA für 30 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen in Aqua dest. gewaschen, 5 min in 60 % Isopropanol inkubiert und 15 min in Ölrot O Lösung gefärbt. Nach erneutem Waschen in 60 % Isopropanol für 5 min wurde Aqua dest. hinzugegeben und die Färbung mikroskopisch analysiert.

3.5.2 Alizarin Rot S Färbung

Alizarin Rot S ist ein Anthraquinonderivat, das mit Kalziumionen komplexiert. Bei der osteogenen Differenzierung von MSC werden Kalziumionen in die EZM eingelagert, die mit Alizarin Rot S einen roten Niederschlag bilden. Osteogen-differenzierte MSC wurden mit PBS gewaschen, mittels 70 % eiskalten Ethanol für 20 min bei 4°C fixiert und mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % Alizarin Rot S Lösung für 10 min gefärbt und fünfmal mit Aqua dest. gewaschen und mikroskopisch analysiert.

3.5.3 Fixierung von Knorpelersatzgewebe

Pellets wurden für 2 h in 4 % PFA aufgenommen, 2x kurz in PBS gewaschen und einer aufsteigenden Isopropanolreihe von 70/96/100 % und Aceton für je 2 h unterzogen, in Paraffin bei 65°C für 2 h inkubiert und in Blockgefäßen mit frischem flüssigem Paraffin eingebettet.

Vor der Fixierung von Knorpelersatzgewebe wurden entweder die Enden des β -TCP mithilfe eines Skalpells auf ca. 2-4 mm ihrer Länge verkürzt oder die Glasträger komplett vom Knorpelersatzgewebe getrennt. Anschließend erfolgte eine partielle Entkalkung für 2 Tage in 1 ml Bouin's Lösung bei 4°C zum Fixieren der Proben. Nach viermaligem Waschen in Aqua dest. wurden die Proben mithilfe einer Isopropanol-Reihe von je 1 ml 70/96/100 % bei 4°C entwässert. Die Proben wurden über Nacht bis maximal 3 Tage in 70 % und 100 % Isopropanol und 8 h in 96 % Isopropanol inkubiert. Nach der Entwässerung erfolgte eine dreistündige Inkubation in 1 ml Aceton bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben für mindestens vier Stunden in flüssigem Paraffin bei 65°C inkubiert und in Blockgefäßen mit frischem flüssigem Paraffin eingebettet.

3.5.4 Anfertigen histologischer Schnitte

In Paraffin eingebettete Proben wurden zunächst auf ca. 4°C gekühlt, bevor an einem Schlitzenmikrotom 5 μ m dünne Schnitte angefertigt wurden. Sobald das Knorpelersatzgewebe und das β -TCP in einer Tiefe von ca. 400-500 μ m freigelegt waren, wurden acht Schnitte kurz auf einem 38°C warmen Wasserbad gestreckt und jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden auf eine auf 36°C temperierte Heizplatte überführt und nach mindestens einer Stunde für mindestens 24 h bei 42°C getrocknet.

3.5.5 Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydrierung von Schnitten

Vor einer histologischen Färbung wurden die Schnitte im organischen Lösungsmittel Rotihistol für 4 x 5 min vom Paraffin befreit. Zur Anfertigung wässriger Färbungen erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Isopropanol-Reihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %) für jeweils 5 min. Zur vollständigen Rehydrierung wurden die Schnitte 5 min in Aqua dest. inkubiert. Danach konnte die Färbung erfolgen. Nach einer immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mit Aquatex und einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Färbung in wässrigen Lösungen wurden die Schnitte kurz in Isopropanol (96 %, 2x 100 %) für 10-30 s teilentwässert und 4 x 5 min in Rotihistol inkubiert, bevor sie mit Neo-Mount und einem Deckglas eingedeckt wurden.

3.5.6 Safranin O-Färbung

Mithilfe des kationischen Farbstoffs Safranin O werden Polyanionen wie sulfatierte GAGs des Knorpels rot-orange angefärbt. Als Gegenfärbung dient Fast Green, so dass Safranin O-ungefärbtes Gewebe grün dargestellt wird. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte die Färbung der histologischen Schnitte in 0,2 % Safranin O-Lösung für 20 min. Anschließend wurden die Schnitte dreimal kurz in Aqua dest. gewaschen und mittels 0,04 % Fast Green-Lösung für 20 s gegengefärbt. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. erfolgte die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben.

3.5.7 Immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ II

Kollagen Typ II wurde durch eine immunhistochemische Färbung nachgewiesen. Der an spezifischen Epitopen gebundene Primärantikörper wurde durch einen Sekundärantikörper gebunden, der mit konjugierter ALP die Kollagene durch Farbniederschlag des umgesetzten ALP-Substrats sichtbar macht. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der histologischen Schnitte wurden sie 2 min in PBS äquilibriert und in eine feuchte Kammer überführt. Sie wurden mit 4 mg/ml Hyaluronidase in PBS pH 5,5 bedeckt und bei 37°C für 15 min verdaut. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 2 min in PBS gewaschen (und mit 1 mg/ml Pronase in PBS für 30 min bei 37°C weiter verdaut. Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindestellen für 30 min mit 5 % BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-Kollagen Typ II Antikörper (1:1000 in 1 % BSA/PBS) über Nacht bei 4°C. Die Negativkontrolle verblieb ohne den Primärantikörper in 1 % BSA/PBS. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit 1x TBS entfernt und der ALP-gekoppelte Sekundärantikörper (Bright Vision) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneute Waschschrte erfolgten. Durch Hinzufügen der ImmPact Vector Red-Substratlösung wurde die spezifische Bindung des Antikörperkomplexes an die entsprechenden Antigene durch Farbniederschlag roter Areale nach bis zu 12 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln visualisiert. Die Färbung wurde durch Waschen in 1x TBS gestoppt. Eine Färbung der Zellkerne erfolgte durch 4-minütige Inkubation der Schnitte in Hämalaun nach Mayer. Anschließend wurden die Schnitte 2x in Leitungswasser gespült und 15 min in Leitungswasser gebläut.

3.6 Härtemessung

Die Härte der Knorpelersatzgewebe wurde mithilfe der Digi Test II Einheit ermittelt. Dabei handelt es sich um einen Indentationstest mit Härteskala sehr niedriger Gummihärte (*Very Low Rubber Hardness*, VLRH) nach DIN ISO 48-3 (ehemals DIN ISO 27588) (Strobel und Herrmann 2006). Die Härte der Proben ergibt sich aus der Eindringtiefe, die ein Kugelstempel mit 2,5 mm Durchmesser nach einer 5-sekündigen niedrigen Anfangskraft (8,3 mN) innerhalb einer 30-sekündigen hohen Gesamtkraft (100 mN) zurücklegt wie folgt

$$VLRH = 100 - 0,1D$$

Je kürzer die Strecke, die innerhalb von 30 s bei konstanter Gesamtkraft vom Kugelstempel zurückgelegt wird, desto härter ist die Probe. Nach der 30-sekündigen Indentation folgt eine 30-sekündige Relaxationsphase mit entspanntem Stempel ohne Krafteintrag. Die Digi Test II Einheit misst dabei die Rückverschiebung des Stempels, die durch die Ausdehnung der Probe erfolgt, und erlaubt so Rückschlüsse auf die Rückverformungseigenschaften der Proben. Die Proben wurden von der Knochenersatzphase mittels Skalpells getrennt und die Knorpelersatzgewebeproben oder Knorpelbiopsien vor der Messung in PBS gewaschen und anschließend auf den Messtisch positioniert. Bei der Messung positionierte sich der Stempel so, dass er Kontakt zu den Proben hatte und die Härtewerte wurden während der Indentations- und der Entspannungsphase aufgezeichnet. Der Härtewert am letzten Indentationszeitpunkt, entsprechend dem 300. Aufzeichnungswert, wurde zur Auswertung der Probenhärte verwendet.

3.7 Isotopen-Einbau zur Messung der GAG- und Kollagen-Neusynthese

Aufgrund ihrer zahlreichen Sulfatierungen kann die Neusynthese von GAG nach mechanischer Belastung durch den Einbau von radioaktiv markiertem Sulfat ($^{35}\text{SO}_4$) gemessen werden. Kollagene sind ein weiterer Hauptbestandteil der Knorpelmatrix und durch ihren hohen Anteil an Prolin bzw. Hydroxyprolin kann die Neusynthese von Kollagen mithilfe des Einbaus von Tritium-markiertem L-Prolin (^3H -Prolin) gemessen werden. Die Knorpelproben wurden direkt nach Ende der Belastungsepisode mithilfe eines Skalpells von der Knochenersatzphase getrennt und in eine 48-Well-Platte für Suspensionskultur auf einem Siebgewebe platziert. Chondrogenes Medium (500 μL pro Probe) wurde mit 4 μCi (0,148 MBq) $^{35}\text{SO}_4$ bzw. 5 μCi (0,185 MBq) ^3H -Prolin versetzt und die Proben im Medium für 24 h bei 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium verworfen und die Proben fünfmal für 20 min mit 1 mM Na_2SO_4 bzw. 1 mM L-Prolin in PBS unter Bewegung gewaschen, um die ungebundenen radioaktiven Stoffe zu entfernen, bevor die Proben in 1 mL TE-Puffer mit 0,5 mg/mL Proteinase K über Nacht bei 65°C und 800 rounds per minute (rpm) in einem Thermoschüttler lysiert wurden. Zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit wurden 25 μL des Verdau gegeben und der Einbau der radioaktiven Isotope im Mikrobeta-Zähler als counts per minute (cpm) detektiert. Die Normierung der Werte erfolgte auf den DNA-Gehalt der jeweiligen Proben.

Ein Vergleich dieser Methode mit einer Fällung radioaktiv markierter GAGs zur Ermittlung der GAG-Synthese wurde in der Arbeitsgruppe durchgeführt und es ergab sich, dass keine GAG Präzipitation notwendig ist, um relative Unterschiede in der GAG-Synthese feststellen zu können.

3.8 Biochemische Analysen

3.8.1 Glykosaminoglykan-Messung in Knorpelersatzgewebe

Die Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts in Knorpelersatzgewebe erfolgte durch den 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) Assay (Farndale et al. 1986). Der Assay basiert auf der metachromatischen Färbung der GAGs durch den Farbstoff DMMB. Zur quantitativen Bestimmung des GAG-Gehalts wurden die mit Proteinase K verdauten Proben nach der radioaktiven Markierung verwendet (Kapitel 3.7). Je 20 μL des Verdauens wurden im Verhältnis 1:20 mit TE-Puffer verdünnt und davon 30 μL in eine 96-Well-Flachbodenplatte vorgelegt. Eine Standardkonzentrationsreihe von 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde aus einer 10 mg/mL Chondroitin-6-Sulfat-Stammlösung schrittweise durch 1:2 Verdünnungen in TE-Puffer hergestellt und ebenfalls je 30 μL vorgelegt. Als Blank diente dasselbe Volumen TE-Puffer. Zu den Proben, dem Standard und dem Blank wurden je 200 μL DMMB-Färbelösung zugegeben und die Absorption bei 530 nm im Wallac 1420 Victor2 gemessen. Die ermittelten Werte wurden auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert.

3.8.2 DNA-Messung in Knorpelersatzgewebe

Der DNA-Gehalt wurde anhand des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits bestimmt. Durch Bindung des Farbstoffs Fluorescein an die DNA wird ein grünes Fluoreszenzsignal emittiert. Der DNA-Gehalt wurde zur Normalisierung der GAG- und Kollagensynthese, sowie für den Gesamt-GAG-Gehalt verwendet. Zunächst wurden die mit Proteinase K verdauten Proben im Verhältnis 1:50 mit TE-Puffer verdünnt und eine Standardkonzentrationsreihe aus einer 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ λ -DNA-Stocklösung in Verdünnungsschritten von 1:2 in TE-Puffer (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 15,625 ng/mL) erstellt. In eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte wurden 20 μL Probe und Standard zu 80 μL vorgelegtem TE-Puffer pipettiert. Als Blank diente das gleiche Gesamtvolumen TE-Puffer. Die Pico Green Färbelösung wurde 1:200 in TE-Puffer verdünnt und je 100 μL zu Blank, Standard und Proben hinzugefügt. Nach einer 5-minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm im Wallac 1420 Victor2 gemessen.

3.8.3 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurde das Knorpelersatzgewebe zunächst mithilfe eines Skalpell von der Knochenersatzphase getrennt und in vorgekühlte 2 mL ‚Safe-Lock‘-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden in einem Lysepuffer bestehend aus 150 μL Phosphosafe, der den enzymatischen Abbau der Phosphatgruppen der Proteine inhibiert, und 1,5 μL Pefabloc, einem Serin-Protease Inhibitor, aufgenommen und in einer Schwingmühle mit je einer eisgekühlten Metallkugel mechanisch für 2 x 2 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Die Ganzzelllysate wurden anschließend bei 13.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und die

Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert. Für die sofortige Verwendung der Lysate für Western Blot Analysen wurde die Konzentration der Proteine bestimmt (3.8.4) und die Proben mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C und 550 rpm für 5 min aufgekocht (3.8.5).

3.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Damit einheitliche Proteinmengen mittels Western Blot analysiert werden können, wurde die Proteinkonzentration der Ganzzelllysate mithilfe des Bradford Assays quantifiziert. Dabei bindet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillantblau an saure und unpolare Seitenketten von Proteinen und bildet mit ihnen Komplexe, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 auf 595 nm verschiebt.

Die Ganzzelllysate wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und eine Standardreihe aus BSA (1 mg/mL) erstellt. Jeweils 10 μL vom Blank (Aqua dest.), Probe und Standard wurde in eine 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert und 200 μL Bradford-Reagenz hinzugefügt. Die Absorptionsmessung erfolgte im Photometer Magellan Tecan bei 595 nm. Durch die definierten Proteinkonzentrationen des Standards konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

3.8.5 SDS-PAGE

Die *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) wird dazu verwendet, um Proteine basierend auf ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Das anionische Tensid (Detergenz) Natriumdodecylsulfat (SDS) überlagert dabei die Eigenladung der Proteine durch negative Ladungen und die denaturierten Proteine bewegen sich im elektrischen Feld, abhängig von ihrer Molekülgröße mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Polyacrylamidgel. 25-30 μg Protein pro Probe wurde mit dem entsprechenden Volumen an 4x Lämmli-Puffer versetzt und die Denaturierung der Proteine erfolgte für 5 min bei 95°C und 550 rpm. Als Größenmarker wurden 5 μL des Precision Plus Protein Standards Dual Color von BIORAD eingesetzt. Für die Auftrennung wurde ein 10 %-iges Trenngel (+5 %-iges Sammelgel) mit 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Bei einer Spannung von 80 V wurden die Proteine zunächst im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 120 V getrennt. Kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreichte, wurde die PAGE gestoppt. Das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen und das Trenngel würde für die Western Blot Analyse verwendet (Kapitel 3.8.6).

3.8.6 Western Blot

Die Proteine wurden von dem SDS-Gel mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Durch die Verwendung spezifischer Primärantikörper und markierter Sekundärantikörper mit Meerettichperoxidase (HRP) wurden bestimmte Proteine auf der Membran

nachgewiesen. Der Nachweis über die HRP erfolgt über ein Chemilumineszenz-Signal, das ein Substrat bei Oxidation durch HRP emittiert.

Der Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Amersham Hybond ECL Nitrozellulosemembran wurde entweder in der Wet-Blot-Apparatur (Mini Trans-Blott Cell, Bio-Rad) bei 100 V für 1 h im Transferpuffer oder mittels der Semi-Dry-Methode für 10 min bei 1,3 A (bis 25 V) mit 1x TBE-Puffer in der Turboblot-Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. Die Membran wurde im Anschluss 10 min in Ponceau S Färbelösung gefärbt und durch Schwenken in Aqua dest. wurden die übertragenen Proteinbanden sichtbar. Zur Detektion mehrere Proteine unterschiedlicher Größe auf der Membran wurde entlang des Standards bei 50 kDa geschnitten. Nach 5 min Waschen in TBS-T erfolgte ein Blockierungsschritt der unspezifischen Bindestellen auf der Membran in 5 % Milch in TBS-T für 1h bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle, ob der Transfer der Proteine erfolgreich war, wurde das Gel 5 min in einer Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in einer Entfärbelösung entfärbt, um verbliebene Proteine im Gel nachzuweisen. Die Inkubation der Membran mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe unten) erfolgte bei 4°C über Nacht (β -Aktin: 1 h bei Raumtemperatur; SOX9 und ERK1/2: 2 h bei Raumtemperatur), gefolgt von 3 x 5 min Waschen in TBS-T. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Detektion erneut für 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde ein HRP-Substrat, dessen Komponenten 1:1 gemischt wurden, gleichmäßig auf der Membran verteilt. In einer Belichtungskammer erfolgte die Detektion des Signals, und Bilder von Lumineszenz- und Markerbanden wurden mithilfe von Photoshop übereinandergelegt.

3.9 ELISA

3.9.1 PGE₂-ELISA

Die Messung des freigesetzten PGE₂ erfolgte mittels ELISA-Messung (Enzo Life Sciences) des konditionierten Mediums der Knorpelersatzgewebe nach den Angaben des Herstellers. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay, in dem ein ALP-konjugiertes PGE₂ mit dem in den Proben vorhandenen PGE₂ um die Bindung eines monoklonalen Antikörpers konkurriert. Das konditionierte Medium wurde auf Eis aufgetaut und für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert, um Verunreinigungen durch Zelldebris zu entfernen. Eine Standardreihe von 2500-39,1 pg/mL wurde aus einer PGE₂-Lösung (50.000 pg/mL) durch Verdünnung in Assay Puffer hergestellt. Anschließend wurden je 100 μ L Probe, Standard und Blank in die Wells einer mit IgG-beschichteten Platte pipettiert und je 50 μ L des PGE₂-ALP-Konjugats sowie des Antikörpers hinzugefügt und die Platte mit einer Folie abgedeckt. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei ca. 500 rpm wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift durch Klopfen auf Papiertücher vollständig vom Waschpuffer befreit. Sofort wurden 200 μ L para-Nitrophenylphosphat (pNpp)-Substratlösung in die Wells pipettiert und die Platte für 45 min bei Raumtemperatur ohne

Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 50 μL Stopp-Lösung angehalten, bevor die Detektion am Omega-Plattenlesegerät bei 405 nm und einer Korrekturwellenlänge von 580 nm erfolgte. Die gemessene Optische Dichte (OD) ist invers-proportional zur PGE_2 -Konzentration in den Proben.

3.9.2 cAMP ELISA

Die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgte mittels ELISA-Messung (Enzo Life Sciences) aus Ganzzelllysaten der Knorpelersatzgewebe nach den Angaben des Herstellers. Bei dem ELISA handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay, in dem ein ALP-konjugiertes cAMP mit dem in den Proben vorhandenen cAMP um die Bindung eines monoklonalen Antikörpers konkurriert. Um eine Messung der cAMP-Konzentration zu ermöglichen, mussten die Versuchsreihen unter Zugabe von 1 mM IBMX 30 min vor Versuchsbeginn erfolgen, ein Phosphodiesteraseinhibitor, der den raschen Abbau von cAMP verhindert. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend in je einem 2 mL ‚Safe-Lock‘-Reaktionsgefäß in 0,1 M HCl aus dem Kit chemisch und unter Verwendung der Schwingmühle mit einer eisgekühlten Metallkugel mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Eine Standardreihe von 20-0,078 pmol/mL wurde aus einer cAMP-Lösung (2.000pmol/mL) durch Verdünnung in 0,1 M HCl hergestellt. Anschließend wurden die Wells mit 50 μL einer Neutralisationslösung vorbehandelt und je 100 μL Probe, Standard und Blank in die Wells einer mit IgG-beschichteten Platte pipettiert und je 50 μL des cAMP-ALP-Konjugats sowie des Antikörpers hinzugefügt und die Platte mit einer Folie abgedeckt. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei ca. 500 rpm wurden die Vertiefungen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift durch Klopfen auf Papiertücher vollständig vom Waschpuffer befreit. Sofort wurden 200 μL pNpp-Substratlösung in die Wells pipettiert und die Platte für 1-2 h bei 37°C nach Herstellerangaben ohne Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 50 μL Stopp-Lösung angehalten, bevor die Detektion am Omega-Plattenlesegerät bei 405 nm erfolgte.

3.10 Molekularbiologische Analysen

3.10.1 Gesamt-RNA Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt mithilfe einer einphasigen Phenol- Guanidinisothiocyanat-Lösung (TriFast/Trizol), die die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und gleichzeitig die RNA stabilisiert. Proteine und DNA sammeln sich mit Chloroform in der organischen Phenol-Chloroform-Phase und an der Phasengrenze, während die RNA in der wässrigen Phase bleibt.

Das β -TCP wurde auf ca. 2 mm seiner Länge mithilfe eines Skalpellens verkürzt und die Proben wurden in 1 mL Trifast/Trizol in ein Polytronröhrchen überführt. Um die Zellyse bei der hohen

Matrixablagerung zu ermöglichen, wurden die Proben mechanisch mittels Polytron zerkleinert. Die Reinigung des Polytronmessers erfolgte vor jeder Probe nacheinander mit je 1 mL 0,5 M NaOH, RNase-freiem Aqua dest. und TriFast/Trizol. Die Lysate wurden in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und mindestens 2 Stunden bei -80°C gefroren. Anschließend wurden sie aufgetaut und 10 min auf Raumtemperatur temperiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 μL Chloroform und die Proben wurden für 30 s gevortext und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert und die wässrige Phase mit der enthaltenen RNA in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 500 μL Isopropanol und Vortexen der Proben für 30s und anschließender Inkubation für 15 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei $13.000 \times g$ und 4°C wurde das Isopropanol verworfen und das Präzipitat zweimal mit 1 mL eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Ethanolreste wurden vollständig durch Verdampfen entfernt und die Gesamt-RNA wurde in 35 μL 10 mM Tris-HCl resuspendiert.

3.10.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 μL Gesamt-RNA durch UV-Lichtabsorption bei 260 nm (UV260) am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Die Reinheit der Probe wurde anhand des Verhältnis UV260/UV280 nm bestimmt. Proteine und Phenole haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. So deutete eine 260/280 Ratio zwischen 1,8 und 2,0 auf eine ausreichend reine nukleinsäurehaltige Probe hin.

3.10.3 Reinigung der Gesamt-RNA aus Knorpelersatzgewebe für mRNA Analysen

Da MSC unter chondrogenen Bedingungen eine Proteoglykan-reiche Matrix ablagern, die die RNA-Isolation kontaminieren kann, musste die Gesamt-RNA zur quantitativen Analyse des Transkriptoms gereinigt werden. Dazu wurde für Knorpelersatzgewebe das Zymoclean Gel DNA Recovery Kit verwendet, indem 4 μg Gesamt-RNA in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und auf ein Gesamtvolumen auf 60 μL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt wurden. Anschließend wurde das dreifache Volumen Agarose Dissolving Buffer (ADB) hinzugefügt und die Proben in Zymo-Spin Säulen 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit je 200 μL Waschpuffer unter 1 min Zentrifugation bei $13.000 \times g$ und 4°C . Nach dem letzten Waschschrte wurden die Proben 1 min trocken zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Die Elution der RNA erfolgte in 15 μL RNase-freiem Wasser nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, bevor das Eluat durch 1-minütiges Zentrifugieren bei $13.000 \times g$ in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgefangen wurde. Auf Eis wurde die RNA-Konzentration (Kapitel 3.10.2) bestimmt und die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.10.4 mRNA-Isolation aus Pellets

Da MSC unter chondrogenen Bedingungen eine Proteoglykan-reiche Matrix ablagern, die die RNA-Isolation kontaminieren kann, wurde die mRNA aus den Gesamt-RNA-Isolaten von Pellets extrahiert. Dazu wurden Oligo(dT)-gekoppelte magnetische Kugeln (Dynabeads, Life Technologies) verwendet, an denen die Poly-A-mRNA binden kann. Eine 1:5 Verdünnung von 20 μL Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser wurde mit 100 μL Dynabeads und 2x Bindungspuffer durch Pipettieren vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die mRNA-gebundenen Kugeln an der inneren Wand der Reaktionsgefäße gesammelt, in dem sie für 5 min in einer magnetischen Halterung platziert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die mRNA-gebundenen Kugeln wurden in Waschpuffer B gewaschen und in 15 μL 10 mM Tris-HCl aufgenommen. Die Elution der mRNA erfolgte durch Inkubation bei 80°C für 2 min in einem Thermoschüttler und die direkte Platzierung in die magnetische Halterung. Dadurch wurden die Kugeln erneut an der inneren Wand der Reaktionsgefäße gesammelt, so dass die mRNA-haltige Lösung von den Kugeln getrennt in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt werden konnte. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.10.5 Reverse Transkription von mRNA

Zur Herstellung eines DNA-Templates für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mRNA in stabilere *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Dazu wurden 500 ng gereinigte Gesamt-RNA auf 9 μL Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 μL Oligo(dT)-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erfolgte eine Denaturierung für 10 min bei 70°C. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde ein Mastermix aus 2 μL RT-Puffer, 1 μL RNaseOUT, 1 μL dNTPs (5 mM), 1 μL Omniscript RT (4 Units) und 5 μL Wasser pro Probe hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die reverse Transkription durch Hitze bei 93°C für 5 min beendet. Die Proben wurden 1:5 oder 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.10.6 Reverse Transkription von miR

Da eine Bindung von Oligo(dT)-Primern oder sonstigen sequenzspezifischen Primern an die meist nur 19-25 Basenpaar langen miR-Moleküle nicht möglich ist, werden bei der Transkription von miR sogenannte Stem-loop RT-Primer eingesetzt. Diese Primer haben am 5'-Ende die komplementäre Basensequenz der spezifischen miR, und bilden am 3'-Ende eine Stamm-schleifenstruktur aus. Auf diese Weise wurden die miR mithilfe der MultiScribe™ Reversen Transkriptase (Applied Biosystems) verlängert und in cDNA transkribiert (Chen et al. 2005). Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. MiR Analysen aus Knorpelersatzgewebe erfolgten aus der Gesamt-RNA.

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>Reaktionsbedingungen:</u>	
1,50 µL	10x RT-Puffer	30 min	16°C
0,19 µL	RNAse Inhibitor	30 min	42°C
0,15 µL	100 mM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	5 min	85°C
1,00 µL	MultiScribe™ Reversen Transkriptase (50 U/µL)	∞	4°C
3,00 µL	5x TaqMan® MicroRNA RT-Primer		
5,00 µL	10 ng Gesamt-RNA		
Ad 15 µL	RNAse-freies Wasser		

3.10.7 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) basiert auf einer DNA Replikation mit zusätzlicher Messung der relativen Zunahme an DNA-Molekülen nach jedem Amplifikationsschritt in Echtzeit. Mithilfe einer DNA-Polymerase, sequenzspezifischen Primern und dNTPs kann eine DNA-Matrize durch iterative Denaturierungs- (Aufbrechen des Doppelstranges), Annealings- (Anlagern von spezifischen Primern) und Elongationszyklen (durch dNTPs und DNA- Polymerase) vervielfältigt werden. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe eines interkalierenden Farbstoffs (hier SYBR® Green I oder FAM), der sich während der Amplifikation an doppelsträngige DNA anlagert. Nach jedem Zyklus wird der Farbstoff angeregt und die Intensität des Emissionslichts wird vom Gerät detektiert. Wenn erstmalig signifikant Hintergrundsignale überschritten werden, wird dieser Wert als *Cycle Threshold* (C_T -Wert) bezeichnet. Er dient als relative Ausgangsmenge in der Probe. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Spezifität des Amplifikats kann bestimmt werden, indem die dsDNA durch kontinuierlichen Temperaturanstieg getrennt wird und das emittierende Licht reduziert wird. Abhängig vom G/C-Gehalt des Produkts und dem abnehmenden Fluoreszenzsignals ergibt sich so für jedes Produkt eine spezifische Schmelzkurve. Mit der qRT-PCR wurden sowohl cDNA Proben aus aufgereinigter Gesamt-RNA als auch miR Proben analysiert.

Reaktionsansatz und -bedingungen für cDNA Proben:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>Reaktionsbedingungen:</u>	
12,5 µL	SYBR® Green Mix	900 s	95°C
0,5 µL	Primer sense	15 s	95°C
0,5 µL	Primer antisense	20 s	58-61°C
2,0 µL	cDNA (1:5 verdünnt)	30 s	72°C
9,5 µL	RNAse-freies Wasser	30 s	95°C
		30 s	55°C
		200 s	0,2°C/s
	Schmelzkurvenanalyse	30 s	95°C

PCR-Reaktionsansatz und Bedingungen für cDNA generiert aus Gesamt-RNA für miR-Analysen:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>Reaktionsbedingungen:</u>	
10,0 µL	2x TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 min	95°C
1,0 µL	TaqMan® MicroRNA Assay	15 s	94°C
1,5 µL	cDNA (10 ng)	60 s	60°C

7,5 µL RNase-freies Wasser

3.10.8 Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung der qRT-PCRs wurde mithilfe der relativen Quantifizierung der Genexpression einzelner Proben durchgeführt. Die C_T -Werte wurden auf interne, konstant exprimierte Referenzgene bezogen, die nicht durch mechanische Belastung reguliert waren. Für mRNA Analysen wurden die Referenzgene *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. Für miR Analysen wurde snRNA U6 als Referenz herangezogen. Die Berechnung erfolgte durch die Subtraktion des C_T -Wertes der Probe von dem Mittelwert der C_T -Werte der Referenzgene (ΔC_T) und die Differenz ΔC_T unter der Annahme einer PCR-Effizienz von $E=1,8$ nach Herstellerempfehlung korrigiert. Die prozentuale Angabe der relativen Genexpression ergab sich wie folgt:

$$\text{Rel. Genexpression} = 1,8^{(\Delta C_T)} * 100 \%$$

3.10.9 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Amplifikate wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und visualisiert. Ein Agarosegel besteht aus langen Agarosepolymeren, die beim Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und bei Abkühlung ein quervernetztes Gel mit definierten Porengrößen bilden. Je höher der Prozentsatz an Agarose, umso stärker sind die Quervernetzungen im Gel. Eine 1,5 % Agarose-Lösung wurde durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer hergestellt, bis auf ca. 60°C abgekühlt und vor dem Gießen mit 4,5 µL des interkalierenden Farbstoffes PeqGreen versetzt. Der Farbstoff fluoresziert unter UV-Bestrahlung, so dass die DNA-Amplifikate sichtbar werden. 12,5 µL PCR-Produkt in 6x Ladepuffer bzw. 5 µL Längenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) wurden in die Taschen des Gels geladen und die negativ geladenen DNA-Fragmente wanderten bei 120 V für 35 min in Richtung Anode, wobei sie ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Die Bandenmuster wurden unter UV-Licht fotografisch dokumentiert und zur Auswertung der qRT-PCR herangezogen.

3.11 Statistik

Statistische Analysen erfolgten mit der Software SPSS 25.0.

Jedes Knorpelersatzgewebe wurde als unabhängiges, biologisches Replikat angesehen. Unterschiede zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten, sowie Unterschiede zwischen belasteter Gruppe und unbelasteter Kontrollgruppe wurden mittels T-Test analysiert. Bei hoher Varianz innerhalb einer Gruppe wurde der Rangsummen-basierte Mann-Whitney-U (MWU)-Test verwendet. $P \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet.

Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die Daten als Balkendiagramm mit dem Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von Knorpelersatzgewebe aus MSC

4.1.1 Charakterisierung von MSC aus Knochenmarkaspiraten

MSC wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Heidelberg und der Spender*innen aus Knochenmarkaspiraten von 47 Patient*innen isoliert, bei denen eine Hüftendoprothese eingesetzt wurde. Das Alter der Patient*innen lag zwischen 24 und 92 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 62 ± 17 Jahren (28 weiblich, 19 männlich).

Um exemplarisch für die ersten Spenderproben zu bestätigen, dass es sich bei den mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation aus dem Knochenmark isolierten Zellen um MSC handelt, wurden die Zellen auf drei etablierte Kriterien zur Charakterisierung von MSC nach Dominici et al. (2006) untersucht. Dabei wurden die Zellen zunächst auf ihre Plastikadhärenz geprüft (Abbildung 4). Die adhärennten Zellen bildeten bereits einen Tag nach der Aussaat sogenannte „Spots“ am Boden der Zellkulturflaschen und wuchsen nach weiterer Expansion bis P3 als homogener Zellrasen. Somit konnte die Plastikadhärenz der isolierten Zellen bestätigt werden.

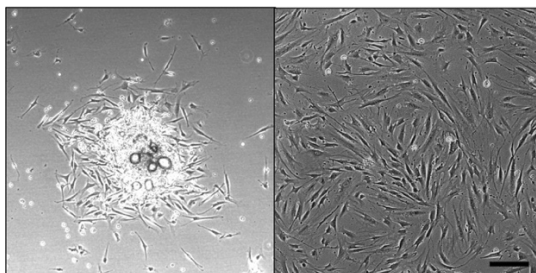


Abbildung 4. Plastikadhärenz und Morphologie isolierter MSC-Populationen aus Knochenmarkaspiraten. MSC wurden mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation aus Knochenmarkaspiraten isoliert und nach wiederholten Waschschritten mit PBS in Zellkulturflaschen überführt und in 12,5 % serumhaltigem ES-Medium + 4 ng/mL FGF-2 bei 37°C und 6 % CO₂ kultiviert. 24 h nach Aussaat wurden nicht-adhärennte Zellen durch einmaliges Spülen mit PBS entfernt und die Zellen in frischem ES-Medium expandiert. Dargestellt sind Hellfeldmikroskopaufnahmen von adhärennten MSC repräsentativer Spenderpopulationen in exemplarischen Bereichen der Zellkulturflaschen. Links: P0, Tag 1 nach Aussaat in Zellkulturflaschen nach Entfernung nicht-adhärenter Zellen. Ein „Spot“ ist erkennbar. Rechts: P3, vor Versuchsansatz. Im Zuge der Expansionskultur proliferierten die Zellen und bildeten einen homogenen Zellrasen aus. Nach dreimaligem Passagieren bei 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz in P3 für die Versuchsreihen verwendet (n=3). Maßstabsbalken 200 µm.

Zur Bestätigung des zweiten Kriteriums nach Dominici et al. (2006) wurde das Oberflächenmarkerprofil der Zellen überprüft. Die isolierten Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (PE oder FITC) markiert und der Anteil der Zellen mit einem positiven Fluoreszenzsignal mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 5). Wie erwartet wurden im Mittel bei über 95 % der Zellen die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 nachgewiesen, während weniger als 2 % der Zellen CD34 und CD45 exprimierten. Somit konnte die MSC-typische Oberflächenmarkersignatur nach Dominici et al (2006) bestätigt werden.

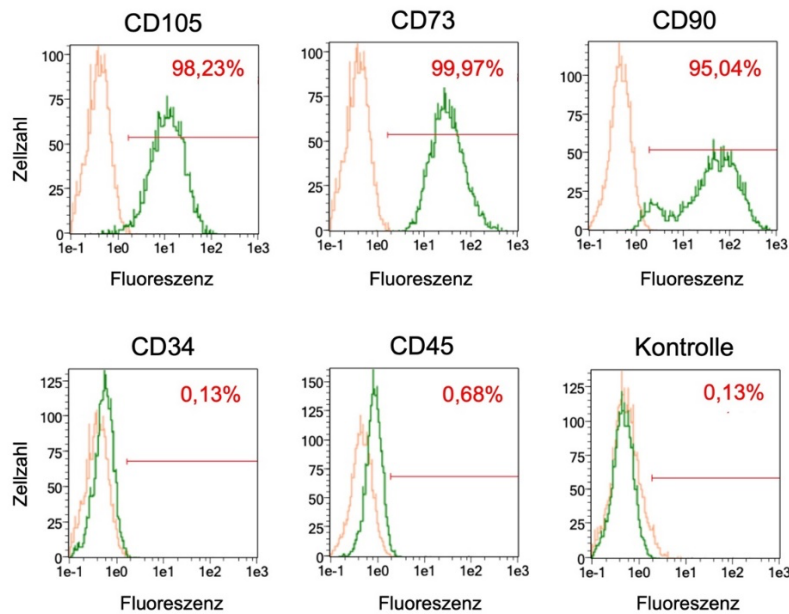


Abbildung 5. Oberflächenmarkerprofil expandierter MSC. MSC wurden nach P3 mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für MSC-typische (CD105, CD73, CD90) und hämatopoetische Oberflächenantigene (CD34, CD45) markiert. Nach Entfernen ungebundener Antikörper wurde das Fluoreszenzsignal der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die dargestellten repräsentativen Histogramme einer Spenderpopulation ($n=2$) zeigen die Zellzahl in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der immunmarkierten Zellen (grüne Kurve) und der ungefärbten Kontrollzellen (orange Kurve). Dargestellt sind die jeweiligen Histogramme für die fünf untersuchten Oberflächenantigene und die nicht-markierte Negativkontrolle einer repräsentativen Spenderpopulation und die Mittelwerte der prozentualen Anteile der fluoreszenzmarkierten Zellen von zwei Spenderpopulationen (rot).

Um das dritte Kriterium nach Dominici et al. (2006), die Multidifferenzierungskompetenz der MSC, zu bestätigen, wurden die MSC nach P3 in die adipogene, osteogene und chondrogene Linie differenziert. Die Differenzierung in die adipogene und osteogene Linie fand in Monolayerkultur statt. Für die chondrogene Linie wurden die Zellen nach P3 in chondrogenem Induktionsmedium mit 10 ng/mL TGF- β 1 aufgenommen, in dem sie spontan kondensierten und Zellaggregate (sogenannte „Pellets“) bildeten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mittels Ölrot O-Färbung als Nachweis für die Differenzierung in die adipogene Linie, mittels Alizarinrot S-Färbung als Nachweis für die osteogene Linie und mittels Safranin O-Färbung von Mikrotomschnitten für die chondrogene Linie analysiert. Bereits nach einem Tag der adipogenen (Abbildung 6A) und osteogenen Differenzierung (Abbildung 6B) im Monolayer wiesen die Zellen eine unterschiedliche Morphologie auf, wobei sie unter adipogenen Bedingungen eine kachelförmige Morphologie mit geringerem Zell-Zell-Kontakt zu den Nachbarzellen zeigten, während sie unter osteogenen Bedingungen eher langgezogen und dicht beieinander wuchsen. Ab Tag 7 unter adipogenen Bedingungen zeigten die Zellen eine zunehmende Anzahl der durch Ölrot O rot gefärbten Lipidtröpfchen, die als Marker für die adipogene Differenzierung dienen. An Tag 21 wurde schließlich eine starke Ölrot O-Färbung erreicht (Abbildung 6A). Unter osteogenen Bedingungen zeigte sich an Tag 14 eine heterogene rote Färbung des

durch Alizarinrot S gefärbten abgelagerten Kalziums, das als Marker für die osteogene Differenzierung dient. An Tag 21 wurde eine starke homogene Färbung erreicht (Abbildung 6B). Somit konnte die erfolgreiche Differenzierung in die adipogene und osteogene Linie bestätigt werden.

Die chondrogen differenzierten Pellets zeigten an Tag 21 noch keine homogene GAG-Ablagerung nach Safranin O-Färbung histologischer Mikrotomschnitte (Abbildung 6C). Vor allem am äußeren Rand der Pellets war keine Färbung erkennbar. Es ist naheliegend, dass die von den chondrogen differenzierten Zellen produzierten Proteoglykane am Rand der Pellets durch das Pipettieren des Mediums in das Zellkulturmedium ausgespült wurden. An Tag 42 zeigten die Pellets eine deutlich intensivere und homogenere Safranin O-Färbung. Die immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ II war bereits an Tag 21 intensiv und homogen bis zum äußeren Rand der Pellets und blieb bis Tag 42 unverändert. Demzufolge konnte auch die erfolgreiche Differenzierung in die chondrogene Linie bestätigt werden.

Somit waren alle drei Kriterien nach Dominici et al (2006) für die aus dem Knochenmark isolierten MSC erfüllt und es handelte es sich bei den isolierten Zellpopulationen um typische MSC.

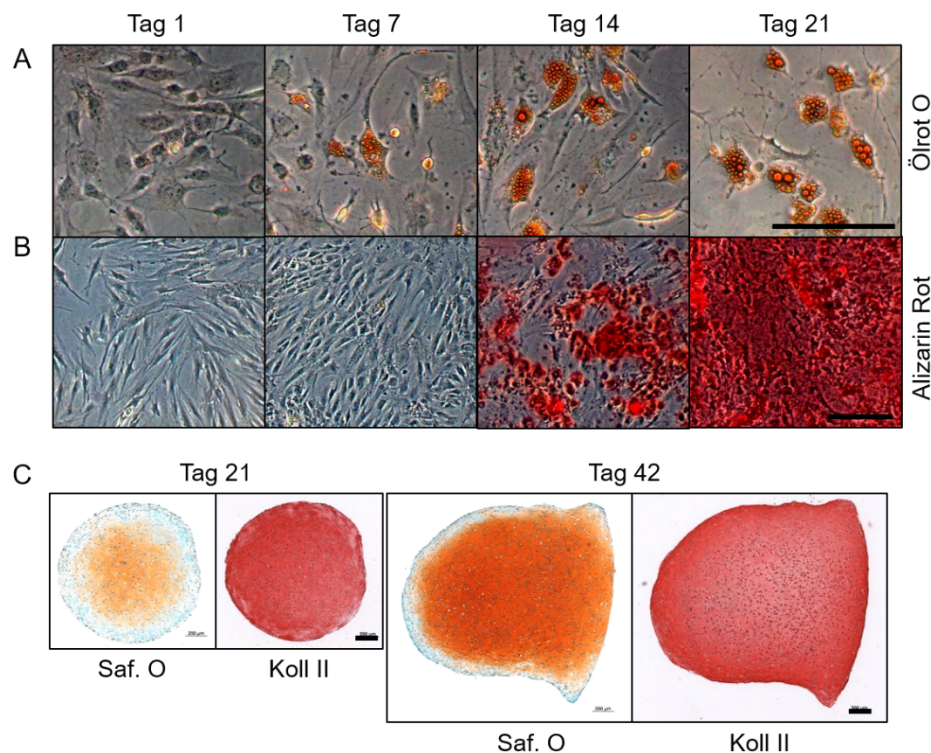


Abbildung 6. Drei-Linien-Differenzierung von MSC in die adipogene, osteogene und chondrogene Linie. MSC wurden nach P3 mithilfe spezieller Differenzierungsmedien für bis zu 21 Tage in Monolayerkultur in die adipogene oder osteogene Linie differenziert oder für bis zu 42 Tagen in Pelletkultur unter 10 ng/mL TGF- β in die chondrogene Linie differenziert. **(A)** Mikroskopische Aufnahmen der Ölrot O-Färbung der adipogen-differenzierten Zellen einer repräsentativen Spenderpopulation (n=3) im Zeitverlauf. Eine Färbung der in den Zellen eingelagerten Lipidtröpfchen war ab Tag 7 erkennbar. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen der Alizarin Rot S-Färbung der osteogen-differenzierten Zellen im Zeitverlauf einer repräsentativen Spenderpopulation (n=3). Eine Färbung von abgelagertem Kalzium war ab Tag 14

erkennbar. (C) Mikroskopaufnahmen der Safranin O-Färbung (Saf. O) und Kollagen Typ II-Immunhistochemie (Koll II) histologischer Schnitte von chondrogen-differenzierten MSC in Pelletkultur zur Darstellung der abgelagerten sulfatierten GAG und von Kollagen Typ II nach 21 und 42 Tagen einer repräsentativen Spenderpopulation (n=3-4). Maßstabsbalken 200 µm.

4.1.2 Wahl einer geeigneten Knochenersatzphase für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe

Unsere Vorarbeiten mit AC nutzten β -TCP als avitales Knochenersatzmaterial und stabilen Untergrund für das vitale AC-basierte Knorpelersatzgewebe, um eine osteochondrale Einheit zu bilden. Da die GAG-Ablagerung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch die Anwesenheit von Kalzium im resorbierbaren β -TCP beeinträchtigt sein könnte, sollte geprüft werden, ob ein neutraler Träger für die Herstellung von MSC-basiertem Ersatzgewebe erforderlich ist, um eine ungestörte GAG-Ablagerung zu gewährleisten. Daher wurden MSC-besiedelte Träger an Tag 2 der Differenzierung entweder mit einem β -TCP-Block (70 % Porosität) oder einem inerten Borosilikatglas (36 % Porosität) kombiniert und für 21 Tage kultiviert. Die Auswirkung der Knochenersatzphase auf die GAG-Ablagerung wurden histologisch mittels Safranin O-Färbung untersucht (Abbildung 7).

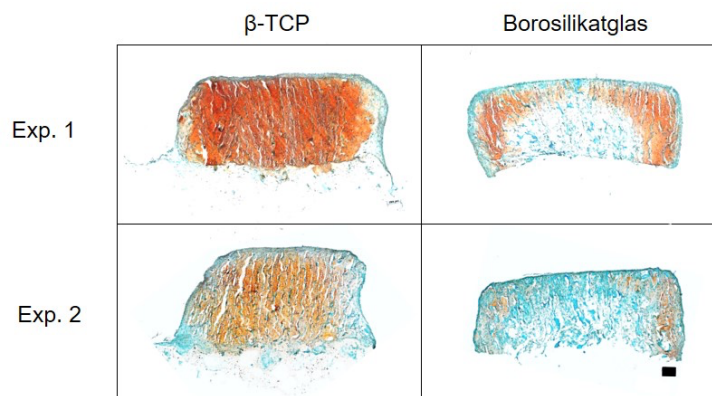


Abbildung 7. Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die GAG-Ablagerung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. MSC wurden nach P3 zur Herstellung von Knorpelersatzgewebe in einen Kollagen I/III-Träger gesiedelt und unter chondrogenen Bedingungen mit 10 ng/mL TGF- β kultiviert. An Tag 2 wurden die zellbesiedelten Träger entweder mit einem zellfreien β -TCP-Block (linke Spalte) oder einem zellfreien Borosilikatglasblock (rechte Spalte) als Knochenersatzphase mittels Fibrinkleber kombiniert und für weitere 21 Tage unter gleichen Bedingungen kultiviert. Dargestellt sind Mikroskopaufnahmen der Safranin O-Färbung histologischer Schnitte des Knorpelersatzgewebes zur Visualisierung der in das Gewebe abgelagerten sulfatierten GAG an Tag 23 von zwei Spenderpopulationen (n=2). Die Knochenersatzphase war am unteren Rand der dargestellten Proben mit dem Knorpelersatzgewebe über den Fibrinkleber verbunden und wurde für die histologische Analyse mithilfe eines Skalpell entfernt. Während die Kombination mit β -TCP eine homogene Verteilung der produzierten GAG im Kollagen I/III-Träger erlaubte, beschränkte sich die GAG-Ablagerung in Kombination mit Borosilikatglas auf den äußeren Rand der Kollagen I/III-Träger. Maßstabsbalken 200 µm.

Während die β -TCP-Knochenersatzphase eine homogene GAG-Ablagerung im gesamten Kollagenträger erlaubte, erfolgte die GAG-Ablagerung in Verbindung mit dem Borosilikatglas-träger vorwiegend am Rand der Kollagenträger. Daher war der β -TCP-Block für die Ablagerung von Knorpelmatrixmolekülen von MSC-basierten Chondrozyten sogar günstiger und konnte als Knochenersatzphase gewählt werden.

4.2 Charakterisierung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Für eine dem nativen Knorpel annähernde Mechanokopplung in Knorpelersatzgewebe sind ein ausreichender GAG-Gehalt und die damit verbundene Härte von entscheidender Bedeutung. In Vorarbeiten erreichte AC-basiertes Knorpelersatzgewebe einen hohen GAG-Gehalt und eine Härte von bis zu 94 % nativen Knorpels nach 21 und 35 Tagen in Kultur, wodurch eine sehr gute Mechanokopplung ermöglicht wurde und ein Erhalt bzw. eine Steigerung der GAG-Synthese nach Belastung etabliert werden konnte (Praxenthaler et al. 2018). Um eine gleichartige Mechanokopplung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe wie in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu ermöglichen, sollte über die Kulturbedingungen ein vergleichbarer GAG-Gehalt und eine möglichst gleiche Härte installiert werden. Dazu musste AC-basiertes Knorpelersatzgewebe erzeugt werden.

AC wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Heidelberg und der Spender*innen aus makroskopisch intaktem Knorpel des Tibiaplateaus und der Femurkondylen von insgesamt 19 OA-Patient*innen, die eine Knieendoprothese erhielten, isoliert. Das Alter der Patient*innen lag zwischen 56 und 87 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 68 ± 11 Jahren (15 weiblich, 4 männlich).

Um zu prüfen, ob auch MSC-basierte Knorpelersatzproben Werte für GAG-Gehalt und Härte wie AC-basiertes Knorpelersatzgewebe nach Ablagerung von Knorpelmatrixmolekülen über 21 bzw. 35 Tage erreichen, wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe nach 3, 21 und 35 Tagen unter chondrogenen Bedingungen mittels histologischer, biochemischer sowie molekularbiologischer Methoden analysiert. Die Safranin O-Färbung zur qualitativen Darstellung sulfatierter Proteoglykane und der immunhistochemische Kollagen II-Nachweis zeigten, wie erwartet, an Tag 3 noch keine Knorpelmatrixablagerung (Abbildung 8). Erst im Laufe der weiteren Kultivierungszeit lagerten AC (Abbildung 8A) und MSC-basierte Chondrozyten (Abbildung 8B) spenderabhängig sowohl GAG, als auch Kollagen Typ II ab. Für AC und MSC ergab sich eine hohe Spendervariabilität, so dass in 3 von 7 AC- und 10 von 24 MSC-Spenderpopulationen an Tag 21 bereits eine deutliche Safranin O- und Kollagen II-Färbung erkennbar war, während diese in den restlichen Spenderpopulationen relativ schwach oder heterogen war. An Tag 35 war die Spendervariabilität weit weniger ausgeprägt und 3 von 4 AC-Spenderpopulationen und 7 von 10 MSC-Spenderpopulationen zeigten eine homogene Ablagerung von GAG und Kollagen II über das gesamte Gewebe.

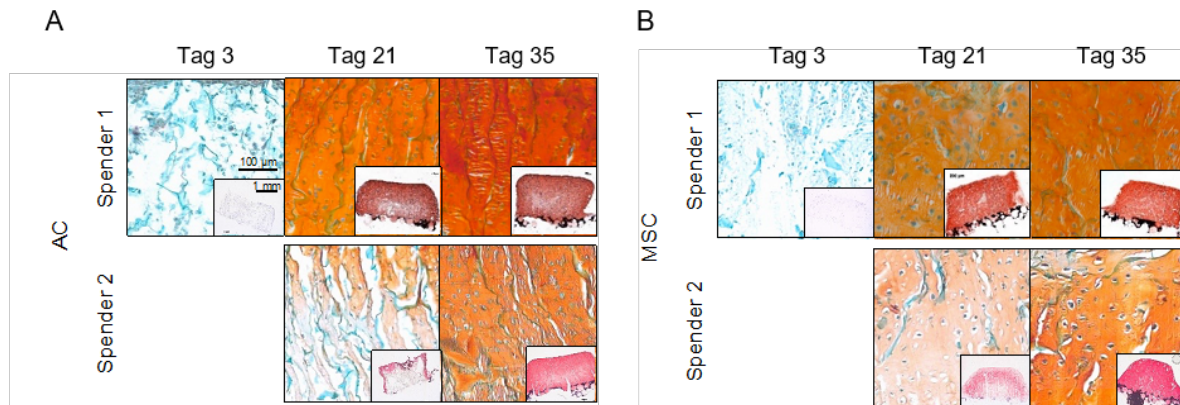


Abbildung 8. EZM-Ablagerung in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe im Zeitverlauf. AC wurden nach P2 und MSC nach P3 in Kollagen I/III-Träger gesiedelt, an Tag 2 mit β -TCP kombiniert und unter gleichen Bedingungen für bis zu 35 Tage in chondrogenem Medium kultiviert. **(A)** Mikroskopaufnahmen von der Safranin O- und der immunhistochemische Kollagen II-Färbung (Einschub) histologischer Schnitte von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 3, 21 und 35. Es sind je eine repräsentative Spenderpopulation für eine homogene EZM-Ablagerung (bezeichnet als Spender 1, 3/7 Spenderpopulationen zeigten eine vergleichbare Färbung an Tag 21 und 3/4 an Tag 35) und einer repräsentativen Spenderpopulation für eine heterogene EZM-Ablagerung an Tag 21, die an Tag 35 ebenfalls eine homogene Verteilung zeigte (bezeichnet als Spender 2, 4/7 Spenderpopulationen zeigten eine vergleichbare Färbung an Tag 21). **(B)** Mikroskopaufnahmen der Safranin O- und der immunhistochemische Kollagen II-Färbung (Einschub) histologischer Schnitte von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 3, 21 und 35. Es sind je eine repräsentative Spenderpopulation für eine homogene EZM-Ablagerung (bezeichnet als Spender 1, 10/24 Spenderpopulationen zeigten eine vergleichbare Färbung an Tag 21 und 7/10 an Tag 35) und einer repräsentativen Spenderpopulation für eine heterogene EZM-Ablagerung an Tag 21, die an Tag 35 ebenfalls eine homogene Verteilung zeigte (bezeichnet als Spender 2, 14/24 Spenderpopulationen zeigten eine vergleichbare Färbung an Tag 21 und 3/10 an Tag 35). Maßstabsbalken 100 μ m.

Die Quantifizierung des GAG- und GAG/DNA-Gehalts bestätigte die zunehmende GAG-Ablagerung im Zeitverlauf in beiden Knorpelersatzgeweben, die an Tag 21 bei $59,07 \pm 14,39 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ für AC und $34,29 \pm 11,64 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ für MSC erreichte. An Tag 35 wurden $61,44 \pm 28,20 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ für AC und $88,53 \pm 18,50 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ für MSC gemessen (Abbildung 9A+B). Ein aus Vorarbeiten mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe bekannter Schwellenwert für eine belastungsinduzierte Steigerung der GAG-Synthese von $600 \mu\text{g GAG}/\text{Probe}$ wurde an Tag 35 in 2 von 4 AC- und 7 von 10 MSC-Spenderpopulationen erreicht. Interessanterweise blieb der DNA-Gehalt im MSC-basierten Knorpelersatzgewebe im Laufe der Differenzierung auf dem gleichen Niveau, während ein signifikanter Anstieg des DNA-Gehalts im AC-basierten Knorpelersatzgewebe auf das 1,9-fache an Tag 21 versus Tag 3 und das 2,3-fache an Tag 35 versus Tag 3 ermittelt wurde (Abbildung 9C). An Tag 21 und 35 zeigten AC und MSC einen vergleichbaren DNA-Gehalt.

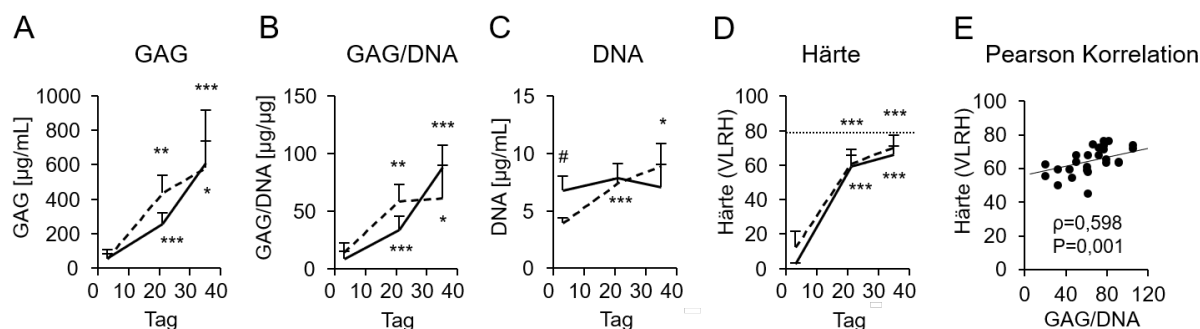


Abbildung 9. Quantitative Bestimmung des GAG-, und DNA-Gehalts sowie der Härte von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe im Zeitverlauf. AC und MSC wurden in Kollagen I/III-Träger gesiedelt, an Tag 2 mit β -TCP kombiniert und für bis zu 35 Tage in chondrogenem Medium kultiviert. **(A)** Der GAG-Gehalt von AC- (gestrichelte Linie, n=3-4, Mittelwerte + Standardabweichung) und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe (durchgezogene Linie, n=7-10, Mittelwerte + Standardabweichung) wurde an Tag 3, 21 und 35 in Proteinase K-verdauten Proben quantitativ mittels DMMB-Assay bestimmt. **(B)** Zur Bestimmung des GAG/DNA-Gehalt von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe wurde der in Proteinase K-verdauten Proben quantifizierte GAG-Gehalt auf den DNA-Gehalt der Proben, der mittels Pico Green Assay quantifiziert wurde, bestimmt. **(C)** DNA-Gehalt in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe ermittelt durch Pico Green Assay in Proteinase K-verdauten Proben. **(D)** Die Härte von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe (n=3-8) wurde durch Indentation mittels *Very Low Rubber Hardness* (VLRH) bestimmt. Die gepunktete Linie stellt die Härte von humanen nativen OA-Knorpelstanzen (n=2, Mittelwert) dar. **(A-D)** * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $P < 0,001$ T-Test Tag 21 bzw. Tag 35 vs. Tag 3. # $P < 0,05$ T-Test AC vs. MSC zum gleichen Zeitpunkt, mit Bonferroni-Korrektur. **(E)** Pearson Korrelation zwischen Härte (VLRH) und GAG/DNA-Gehalt von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 und 35 (dargestellt als schwarze Kreise, n=27 Proben). Die Pearson Korrelation (dargestellt als Linie, Pearson Koeffizient $\rho=0,598$) zeigt eine positive, signifikante ($P=0,001$) Korrelation zwischen Härte und GAG/DNA-Gehalt der Proben.

Wie schon für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe aus Vorarbeiten bekannt, nahm auch die Härte von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe im Laufe der Differenzierung signifikant zu und zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zu AC-basiertem Knorpelersatzgewebe (Abbildung 9D). An Tag 21 wurde eine Härte entsprechend 77 % des Wertes nativer Knorpelstanzen für AC- und 75 % für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe ermittelt. An Tag 35 betrug die mittlere Härte von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe 89 % und die mittlere Härte von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe 84 % von nativem Knorpel. Wie erwartet korrelierte die Härte von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe signifikant mit dem GAG/DNA-Gehalt der Proben mit einem Pearson Koeffizient von 0,598 ($P=0,001$), so dass ein steigender GAG/DNA-Gehalt mit einer steigenden Härte des Knorpelersatzgewebes einherging (Abbildung 9E).

Somit erlaubten die gewählten Kulturbedingungen auch für die MSC-Gruppe das Erreichen von nahezu gleicher Härte und gleichem GAG-Gehalt wie AC-basiertes Knorpelersatzgewebe. Damit wurden die zwei wichtigsten Bedingungen für eine möglichst gleichartige Mechanokopplung in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch die gewählte Kulturführung erfüllt.

Um die erfolgreiche Differenzierung beider Zelltypen im Knorpelersatzgewebe auch auf molekularer Ebene zu bestätigen, wurden Knorpelmatrix-assoziierte Marker mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 10). Die *ACAN*-Expression verblieb bei AC im Zeitverlauf auf dem gleichen Niveau, während sie bei MSC von Tag 3 bis 35 signifikant anstieg. Dabei war die *ACAN*-Expression an Tag 3 in MSC signifikant niedriger als in AC. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei AC bereits um Chondrozyten handelt und MSC sich erst noch unter chondrogenen Bedingungen in die chondrogene Linie differenzieren müssen (Abbildung 10A). Die *COL2A1*-Expression stieg im Zeitverlauf sowohl bei AC als auch bei MSC signifikant an. Wie bei *ACAN* war die *COL2A1*-Expression in MSC an Tag 3 signifikant niedriger als in AC. Interessanterweise erreichten MSC an Tag 35 eine signifikant höhere *COL2A1*-Expression als AC (Abbildung 10B). Die Expression der Chondroitinsulfatsynthase (*CHSY1*) blieb im Zeitverlauf konstant und zeigte ähnliche Expressionsspiegel in beiden Zelltypen (Abbildung 10C). Die Expression von *COMP*, einem pentamerischen Glykoprotein, das mit verschiedenen Komponenten der EZM interagiert und zu deren Integrität beiträgt, stieg im Zeitverlauf in MSC an, während sie in AC auf einem hohen Niveau verblieb. Bemerkenswerterweise war *COMP* an Tag 3 im Trend ($P=0,052$) und an Tag 21 und 35 in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe signifikant höher exprimiert als in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe (Abbildung 10D). Dies könnte auf eine potenziell unterschiedliche EZM-Zusammensetzung in AC- und MSC-basiertem Knorpel hinweisen.

Insgesamt ermöglichten die gewählten Kulturbedingungen eine erfolgreiche (Re)differenzierung beider Zelltypen auch auf molekularer Ebene.

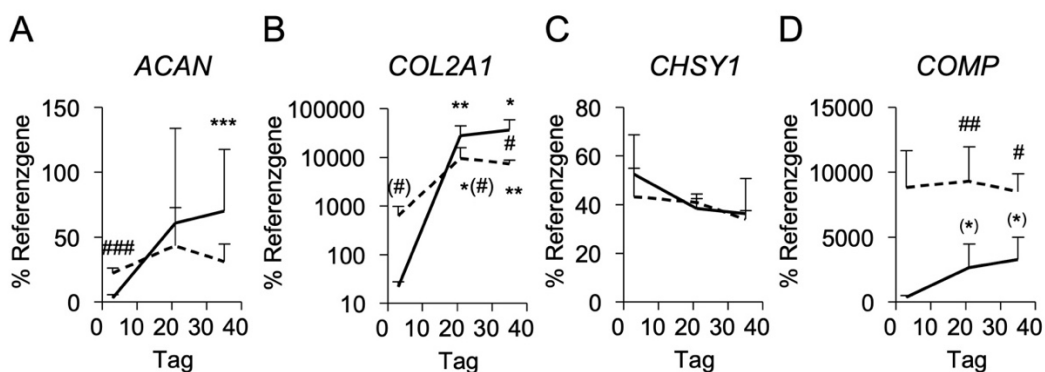


Abbildung 10. Relative Genexpression knorpeliger Differenzierungsmarker in AC- und MSC-basierten Chondrozyten im Zeitverlauf. AC und MSC wurden nach Expansion in Kollagen I/III-Träger gesiedelt, an Tag 2 mit β -TCP kombiniert und für bis zu 35 Tage in chondrogenem Medium kultiviert. Die Genexpression von (A) *ACAN*, (B) *COL2A1*, (C) *CHSY1* und (D) *COMP* wurde in AC und MSC-basierten Chondrozyten mittels qRT-PCR untersucht. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. AC-Daten sind als gestrichelte Linie (n=3-4), MSC-Daten als durchgezogene Linie (n=4-8) dargestellt (Mittelwerte + Standardabweichung). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ T-Test Tag 21 bzw. Tag 35 vs. Tag 3; # $P<0,05$, ## $P<0,01$, ### $P<0,001$, #### $P<0,001$ T-Test AC vs. MSC zum gleichen Zeitpunkt mit Bonferroni-Korrektur.

Somit konnte gezeigt werden, dass die gewählten Kulturbedingungen in AC- und MSC-basierendem Knorpelersatzgewebe über eine etwa gleich starke GAG-Ablagerung dieselbe Härte aufbauten und eine erfolgreiche (Re)differenzierung der Zellen bedingten. Daher sollte mit den gewählten Kulturbedingungen eine möglichst vergleichbare Mechanokopplung in beiden Knorpelersatzgeweben erreicht worden sein.

4.2.1 Mechanokopplung während der gewählten Belastungsperiode

Eine konstante Mechanokopplung vom Beginn bis zum Ende der Belastung ist eine wichtige Voraussetzung für die Gewährleistung der Mechanotransduktion und Mechanoadaptation im Knorpelersatzgewebe. Für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe war gezeigt worden, dass die einmalig angewandte dreistündige Belastungsperiode zu keiner messbaren Änderung des GAG/DNA-Gehalts und der Härte führte (Scholtes et al. 2018). Ein Verlust von Knorpelmatrixmolekülen während der Belastung könnte die Mechanokopplung im MSC-basierten Knorpelersatzgewebe beeinträchtigen. Um sicherzustellen, dass es auch für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe nicht zu einem schnellen Härteabfall während der dreistündigen Belastung kommt, wurden der GAG/DNA-Gehalt und die Härte nach erfolgter Belastung im Vergleich zu den nicht-belasteten Kontrollen analysiert. Als Kontrollgruppe wurde AC-basiertes Knorpelersatzgewebe verwendet. Da AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 3 noch keine EZM-Ablagerung im Träger aufwies, wurden nur die Zeitpunkte Tag 21 und Tag 35 untersucht.

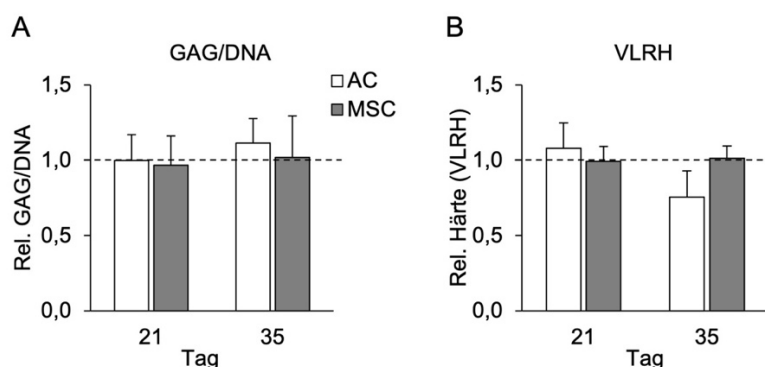


Abbildung 11. Einfluss der Belastung auf GAG/DNA-Gehalt und Härte von AC- und MSC-basierendem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 und Tag 35. AC und MSC wurden in Kollagen I/III-Träger gesiedelt, an Tag 2 mit β -TCP kombiniert und für bis zu 35 Tage in chondrogenem Medium kultiviert und an Tag 21 oder an Tag 35 mit dem dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokoll belastet. **(A)** Der relative (rel.) GAG/DNA-Gehalt in Proteinkinase K verdauten Proben wurde mittels DMMB und Pico Green Assay von belastetem und nicht-belastetem AC- (weiße Balken, $n=3$, Mittelwerte + Standardabweichung) und MSC-basierendem Knorpelersatzgewebe (graue Balken, $n=7-10$, Mittelwerte + Standardabweichung) an Tag 21 und Tag 35 bestimmt. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. **(B)** Die relative (rel.) Härte belasteter Proben und nicht-belasteter Kontrollen von AC- und MSC-basierendem Knorpelersatzgewebe ermittelt durch *Very Low Rubber Hardness* (VLRH)-Indentationsmessung an Tag 21 und Tag 35 ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. Es wurden keine signifikanten

Unterschiede zwischen belasteten und nicht-belasteten Proben, sowie zwischen AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe gefunden (T-Test).

Bezüglich GAG/DNA-Gehalt wurde weder bei AC-, noch bei MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe ein signifikanter Unterschied zwischen den unbelasteten Kontrollen und belasteten Proben an Tag 21 und Tag 35 beobachtet (Abbildung 11A). Passend zum GAG/DNA-Gehalt wies auch die Härte keinen signifikanten Unterschied zwischen den belasteten Proben und den unbelasteten Kontrollen von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe auf (Abbildung 11B).

Somit führte die einmalige Anwendung des dreistündigen physiologischen Belastungsprotokolls nicht zu einem messbar unterschiedlichen Härteabfall zwischen beiden Gruppen während der Belastung. Damit war es zulässig davon auszugehen, dass die Mechanokopplung in beiden Knorpelersatzgeweben vom Beginn bis zum Ende jeder Versuchsreihe konstant gehalten werden konnte, was eine wichtige Voraussetzung für einen standardisierten Vergleich von Mechanotransduktions- und Mechanoadaptierungsmechanismen beider Knorpelersatzgewebe darstellt.

4.3 Mechanotransduktion in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Um adäquat auf mechanische Reize reagieren zu können, müssen diese im Zuge der Mechanotransduktion von den Zellen erkannt und in intrazelluläre Signale übersetzt werden. Da ermittelt werden sollte, ob AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe Unterschiede in der Mechanotransduktion aufweisen, wurden die bereits in Abbildung 2 dargestellten wichtigen Parameter für eine Beurteilung der Mechanotransduktion im Knorpelersatzgewebe beider Zellquellen vergleichend analysiert. Dies umfasste die Expression mechanosensitiver Rezeptoren wie Integrine, die Aktivierung des Mechanotransduktionswegs ERK1/2 sowie die Regulation mechanosensitiver Gene und microRNAs.

4.3.1 Die Regulation der Integrinexpression nach mechanischer Belastung von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Da Unterschiede in der Expression wichtiger Mechano-Rezeptoren wie Integrine die Erkennung mechanischer Reize beeinflussen können, wurde die Expression der wichtigsten Integrin $\alpha 5$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$ -Ketten in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 35 sowohl ohne als auch mit mechanischer Belastung untersucht.

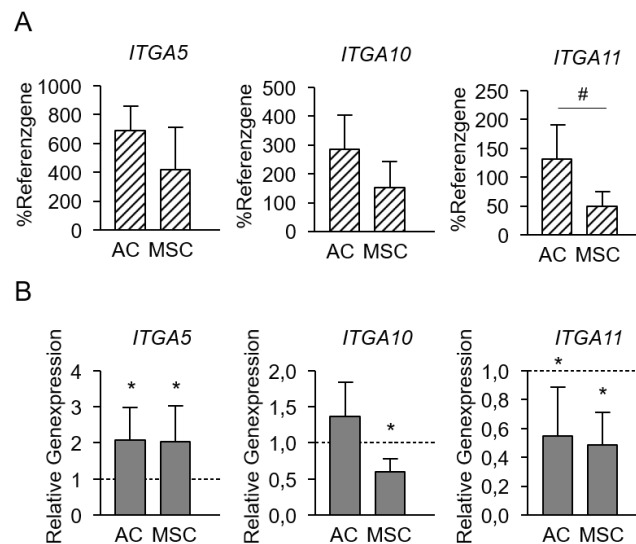


Abbildung 12. Integrinexpression in AC- und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 35. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 35 Tage in chondrogenem Medium kultiviert und an Tag 35 mit dem dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokoll belastet. **(A)** Die Genexpression von *ITGA5*, *ITGA10* und *ITGA11* wurde in nicht-belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) mittels qRT-PCR analysiert. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. # $P < 0,05$, T-Test AC vs. MSC-basierte Chondrozyten. **(B)** Die Genexpression von *ITGA5*, *ITGA10* und *ITGA11* wurde in belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen mittels qRT-PCR analysiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Sponderpopulation wurden auf 1 gesetzt und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$, MWU belastet vs. Kontrolle, $n=4$.

Im Vergleich der basalen Expressionsspiegel zwischen AC- und MSC-basierten Chondrozyten zeigte sich eine signifikant höhere *ITGA11*-Expression (2,5-fach) in AC (Abbildung 12A). Trotz niedrigerer mittlerer Spiegel von *ITGA5* und *ITGA10* in MSC wurden keine signifikanten Unterschiede erreicht.

In AC-basiertem Knorpelersatzgewebe hatten wir bereits beobachtet, dass die gewählte physiologische Belastungsepisode an Tag 35 zu einer Stimulation der *ITGA5*-Expression und einer Reduktion der *ITGA11*-Expression führte, während die knorpeltypische *ITGA10*-Expression durch die Belastung nicht beeinflusst war (Hecht 2020). In der hier vorgelegten Arbeit konnte die signifikante Stimulation der *ITGA5*- und die Reduktion der *ITGA11*-Expression in AC durch Belastung bestätigt werden (Abbildung 12B). MSC-basierte Chondrozyten reagierten ebenfalls mit einer signifikanten Stimulation von *ITGA5* und einer Reduktion von *ITGA11* auf die Belastung. Interessanterweise zeigten MSC-basierte Chondrozyten, anders als AC, eine signifikante Reduktion der *ITGA10*-Expression nach Belastung. Die *ITGA10*- und *ITGA11*-Rezeptoren enthalten Bindestellen für Kollagen Typ II, so dass eine geringere *ITGA11*-Expression in MSC-basierten Chondrozyten und eine belastungsinduzierte Reduktion von *ITGA10* auf eine reduzierte Wahrnehmung mechanischer Reize durch MSC-basierte Chondrozyten hinweisen könnte, sollten sich solche Unterschiede auch auf Proteinebene ergeben. Daher wurde als nächstes geprüft, ob die geringere Integrinexpression in MSC-

basierten Chondrozyten auch mit einer reduzierten Aktivierung des wichtigen, Integrin-assoziierten Mechanotransduktionswegs pERK1/2 einherging.

4.3.2 Die Aktivierung von pERK1/2 in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch mechanische Belastung

Da Integrine Mechanotransduktoren sind und den bekannten mechanosensitiven Signalweg pERK1/2 aktivieren, wurde der Einfluss der physiologischen Belastung auf die pERK1/2-Spiegel in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe verglichen. Dazu wurden belastete Proben und unbelastete Kontrollen unmittelbar nach Belastungsende in flüssigen Stickstoff verbracht und Ganzzelllysate mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht.

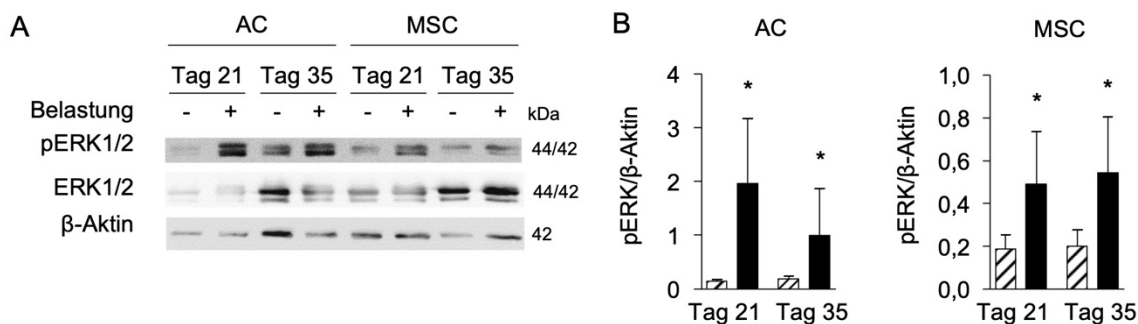


Abbildung 13. Belastungsinduzierte pERK1/2-Aktivierung in AC- und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 und 35. (A) Die pERK1/2-Spiegel wurden in Ganzzelllysaten von AC und MSC-basierten Chondrozyten in belasteten und nicht-belasteten Proben mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt sind die pERK1/2-Spiegel je einer repräsentativen Spenderpopulation für AC und MSC (n=3-4). Als Ladekontrollen dienten das Gesamtprotein von ERK1/2 sowie β-Aktin. (B) Densitometrische Analyse der mittels Western Blot visualisierten pERK1/2-Proteinbanden im Verhältnis zu β-Aktin der nicht belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) AC- und MSC-basierter Chondrozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von n=3-4 Spenderpopulationen. *P≤0,05, Mann-Whitney-U-Test belastete Proben vs. nicht-belastete Kontrollen.

An Tag 21 und 35 wurde pERK1/2 in allen vier untersuchten AC-Spenderpopulationen durch die Belastung stimuliert (Abbildung 13A). Wie AC reagierten auch MSC-basierte Chondrozyten an Tag 21 und Tag 35 auf die Belastung mit einer Stimulation von pERK1/2 in allen drei untersuchten Spenderpopulationen. Die semiquantitative densitometrische Analyse der Western Blot Signale bestätigte eine signifikante belastungsinduzierte Steigerung der pERK1/2-Spiegel normalisiert auf β-Aktin an Tag 21 und Tag 35 in AC und MSC-basierten Chondrozyten (Abbildung 13B). Alles in allem resultierte die mechanische Belastung an Tag 21 und Tag 35 in AC und MSC-basierten Chondrozyten in einer gleichartigen Aktivierung des bekannten pERK-Mechanotransduktionsweg, obwohl Unterschiede in der Integrin Genexpression beobachtet wurden.

4.3.3 Die belastungsinduzierte Expression mechanosensitiver Gene in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Um zu prüfen, ob es im Zuge der Mechanotransduktion auch zu einer gleichartigen Regulation mechanosensitiver Gene in beiden Gruppen kam, wurde die Expression jener mechanosensitiven Gene untersucht, die in Vorarbeiten mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 35 als signifikant reguliert erkannt worden waren.

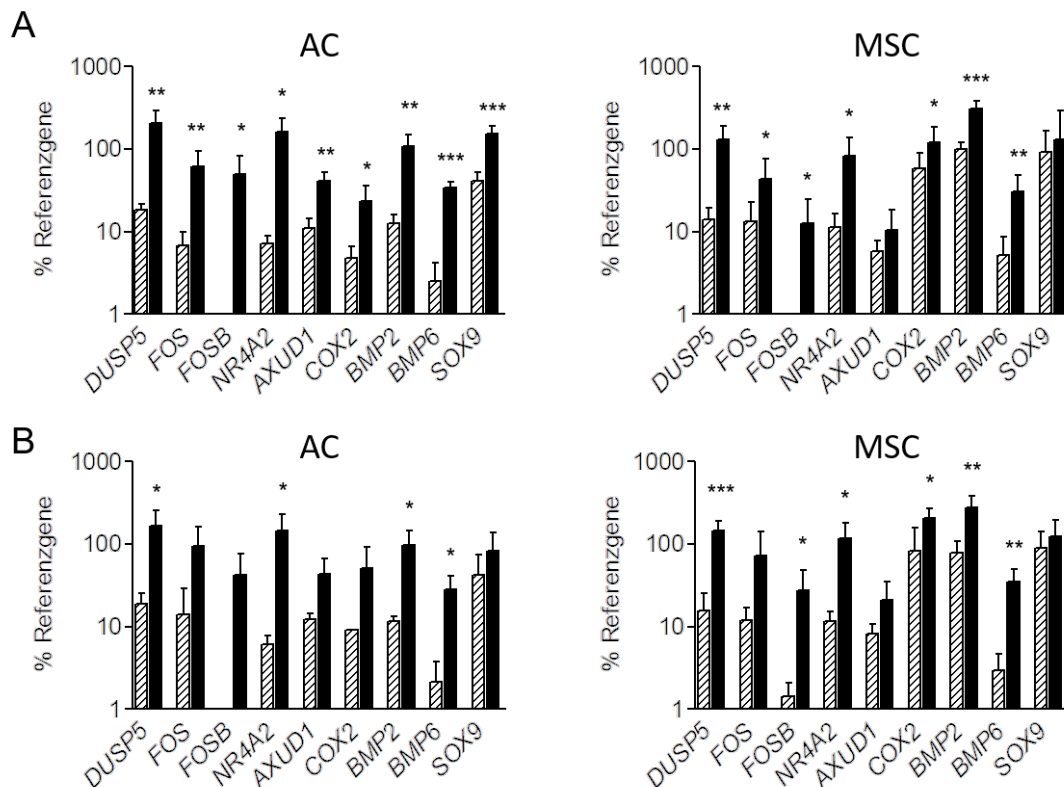


Abbildung 14. Regulation der mechanosensitiven Genexpression in AC- und MSC-basierten Chondrozyten durch Belastung. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde in chondrogenem Medium kultiviert und an **(A)** Tag 21 (n=5-8) oder **(B)** Tag 35 (n=4-6) mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet und die Expression bekannter mechanosensitiver Gene mittels qRT-PCR in nicht-belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) analysiert. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 T-Test belastete Proben vs. nicht-belastete Kontrollen.

Die untersuchten mechanosensitiven Gene umfassten die mit dem MAPK-Signalweg-assoziierten Gene *DUSP5*, *FOS* und *FOSB*, das dem Retinsäuresignalweg zugeordnete Gen *NR4A2*, das dem WNT-Signalweg zugehörige *AXUD1*, das NFκB-Zielgen *COX2* und die BMP-Liganden *BMP2* und *BMP6*. Des Weiteren wurde der Transkriptionsfaktor *SOX9*, der maßgeblich die Expression von Knorpelmatrixmolekülen aktiviert, analysiert. An Tag 21 ergab sich für AC, wie bereits in früheren Studien beschrieben, eine signifikante Steigerung der Expression der gewählten mechanosensitiven Gene (Abbildung 14A). MSC-basierte Chondrozyten reagierten ebenfalls mit einer signifikanten belastungsinduzierten Steigerung der Expression der

meisten mechanosensitiven Gene (Abbildung 14B). Anders als in AC jedoch, wo alle fünf untersuchten Spenderpopulationen an Tag 21 mit einer Stimulation der *SOX9*-Expression auf die Belastung reagierten, wurde in MSC-basierten Chondrozyten keine signifikante Stimulation der *SOX9*-Expression erhalten aufgrund einer inkonsistenten Regulation in verschiedenen Spenderpopulationen. Fünf von acht MSC-Spendern reagierten dabei mit einer Stimulation der *SOX9*-Expression an Tag 21, während drei von acht mit einer Reduktion von *SOX9* reagierten (Daten nicht gezeigt). Auch an Tag 35 zeigte AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe ein ähnliches belastungsinduziertes Expressionsprofil der mechanosensitiven Gene. Aufgrund einer geringeren Spenderzahl ($n=4-6$) als an Tag 21 ($n=5-8$) wurden allerdings weniger Gene statistisch signifikant reguliert. Auch an Tag 35 war die *SOX9*-Expression wie an Tag 21 in allen untersuchten AC-Spenderpopulationen ($n=4$) durch die Belastung induziert, während nur vier von sechs MSC-Spenderpopulationen mit einer Stimulation der *SOX9*-Expression auf die Belastung reagierten. In einem von sechs MSC-Spenderpopulationen war die *SOX9*-Expression durch die Belastung reduziert und in einer Spenderpopulation nicht reguliert.

Somit induzierte die Belastung eine ähnliche Regulation der untersuchten mechanosensitiven Gene in AC und MSC-basierten Chondrozyten, so dass sich auch hier eine gleichartige Mechanotransduktion zeigte. Einen wichtigen Unterschied zu AC stellte jedoch eine uneinheitliche belastungsabhängige *SOX9*-Expression in MSC-basierten Chondrozyten dar, die auf mögliche Unterschiede für die Produktion von Knorpelmatrixmolekülen hinweisen könnte.

Interessanterweise deuteten die Genexpressionsspiegel unbelasteter Proben an Tag 21 und Tag 35 allerdings darauf hin, dass MSC-basierte Chondrozyten eine stärkere Basalexpression von *COX2*, *BMP2* und *SOX9* verglichen mit AC haben könnten. Um dies zu prüfen, wurde ein statistischer Vergleich der basalen Expressionsspiegel dieser drei Gene in unbelasteten Kontrollen von AC versus MSC-basierten Chondrozyten durchgeführt (Abbildung 15).

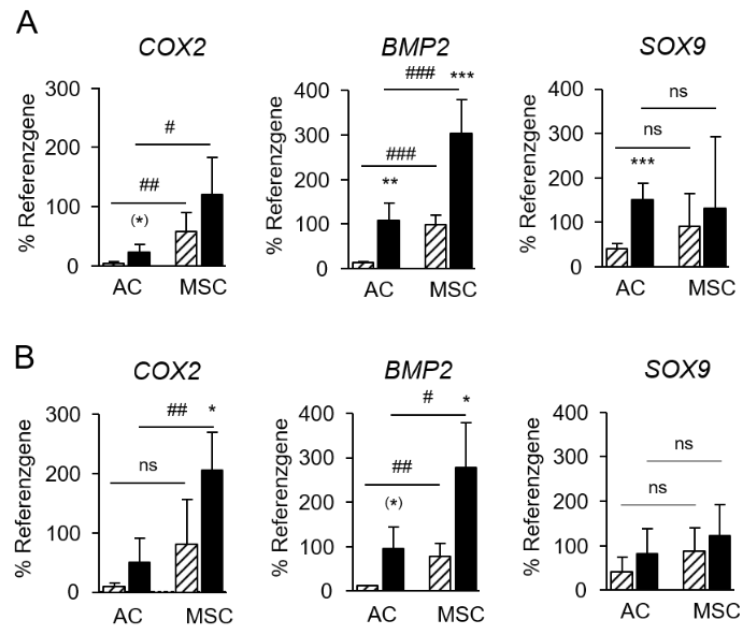


Abbildung 15. Vergleich der Expression mechanosensitiver Gene zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde in chondrogenem Medium kultiviert, an Tag 21 oder Tag 35 mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet und die Expressionsspiegel von *COX2*, *BMP2* und *SOX9* der nicht-belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) mittels qRT-PCR analysiert. **(A)** Die basalen Expressionsspiegel der unbelasteten Kontrollen, sowie der belasteten Proben wurden in AC versus MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 (AC n=5, MSC n=8) und **(B)** an Tag 35 (n=4-6) verglichen. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 T-Test AC vs. MSC. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 T-Test belastete Proben vs. nicht-belastete Kontrollen mit Bonferroni-Korrektur.

Tatsächlich zeigten unbelastete MSC-basierte Chondrozyten an Tag 21 signifikant höhere absolute Spiegel der *COX2* mRNA bezogen auf die Referenzgene als unbelastete AC (12-fach, P=0,004, Abbildung 15A). Auch *BMP2* war in MSC-basierten Chondrozyten verglichen mit AC in der Kontrollgruppe (8-fach, P=0,000002) signifikant höher exprimiert. Für *SOX9* ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten aufgrund einer hohen Varianz in der MSC-Gruppe (Abbildung 15A). An Tag 35 (Abbildung 15B) war die *COX2*-Expression in den unbelasteten Kontrollen zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten nicht signifikant unterschiedlich, bedingt durch eine hohe Varianz in der MSC-Gruppe. MSC-basierte Chondrozyten zeigten an Tag 35 ähnlich wie an Tag 21 eine 7-fach höhere (P=0,002) *BMP2*-Expression in den unbelasteten Kontrollen verglichen mit AC. Wie an Tag 21 war die *SOX9*-Expression in AC- und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 35 nicht signifikant unterschiedlich.

Die signifikant höheren Expressionsspiegel von *COX2* und *BMP2* in MSC-basierten Chondrozyten verglichen mit AC an Tag 21 wurden auch in den belasteten Proben beibehalten. Dabei war die *COX2*-Expression in den belasteten Proben an Tag 21 um das 5-fache (P=0,008, Abbildung 15A) und an Tag 35 um das 4-fache (P=0,003, Abbildung 15B) höher in MSC-basierten Chondrozyten als in AC. Auch die höhere *BMP2*-Expression in MSC vs. AC wurde in

der Belastungsgruppe an beiden Zeitpunkten beibehalten (3-fach, Tag 21 $P=0,00009$; Tag 35 $P=0,011$). Wie auch für die unbelasteten Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied der SOX9-Expression in den belasteten Proben von AC und MSC-basierten Chondrozyten.

Somit zeigten MSC-basierte Chondrozyten zwar keine Unterschiede in der Aktivierung der bekannten mechanosensitiven Gene durch Belastung, wiesen aber höhere Hintergrundspiegel der Expression von *BMP2* und *COX2* auf, die auf mögliche Unterschiede in der Aktivität der mit ihnen assoziierten Signalwege hindeuten könnten.

4.3.4 Die Mechanoregulation von microRNAs in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Da miRs als epigenetische Regulatoren möglicherweise einen Einfluss auf die Mechanotransduktion und die nachfolgende Mechanoadaptation haben könnten, sollte geprüft werden, ob in MSC-basierten Chondrozyten ein unterschiedliches belastungsinduziertes miR-Expressionsprofil zu AC vorlag. Dazu wurden jeweils unbelastete Kontrollen und belastete Proben an Tag 35 Bedingungen mittels qRT-PCR auf die Regulation von drei ausgewählten miRs untersucht.

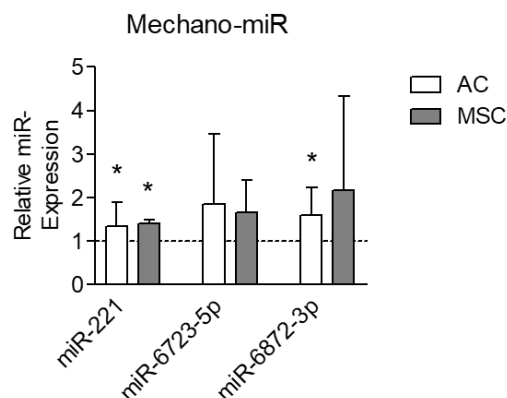


Abbildung 16. Regulation der Mechano-miR-Expression in AC- und MSC-basierten Chondrozyten durch Belastung an Tag 35. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 35 Tage vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Gesamt-RNA aus den belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen wurde isoliert, spezifisch jede miR transkribiert und anschließend via qRT-PCR analysiert. Als Referenz wurde snRNU6 verwendet. Die relative miR-Expression ist dargestellt als Mittelwerte + Standardabweichung belasteter Proben von AC (weiße Balken, n=10) und MSC-basierter Chondrozyten (graue Balken, n=3). Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 (gestrichelte Linie) gesetzt und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. * $P<0,05$ T-Test belastete Proben vs. nicht belastete Kontrollen.

Wie aus Vorarbeiten bekannt war (Hecht et al. 2019), resultierte die Belastung von AC-basiertem Knorpelersatzgewebe in einer signifikanten Stimulation der Expression von miR-221 und miR-6872-3p, während sie für miR-6723-5p aufgrund einer hohen Spendervariabilität nur im Trend erhöht war (Abbildung 16). Ähnlich wie bei AC war miR-221 auch in MSC-basiertem

Knorpelersatzgewebe signifikant durch die Belastung an Tag 35 erhöht, während sich für miR-6723-5p und miR-6872-3p aufgrund einer hohen Spendervariabilität nur ein Trend zu einer belastungsinduzierten Stimulation ergab.

Somit wiesen AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe ein sehr ähnliches belastungsinduziertes Expressionsprofil der untersuchten mechano-miRs auf.

Alles in allem zeigten MSC-basierte Chondrozyten wenige Unterschiede in der Integrinexpression zu AC, eine gleichartige pERK1/2-Aktivierung und reagierten, vor einem Hintergrund höherer Expressionsspiegel von *BMP2* und *COX2*, mit einer ähnlichen Regulation mechanosensitiver Gene und miRs. Lediglich *SOX9* war in MSC-basierten Chondrozyten variabler reguliert oder unbeeinflusst im Vergleich zu AC. Somit antworteten MSC mit einer ähnlichen Regulation der wichtigsten Mechanotransduktionsparameter wie AC.

4.4 Mechanoadaptierung in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Wie bereits in Abbildung 2 dargestellt, können Chondrozyten nach erfolgter Mechanotransduktion, falls erforderlich, im Zuge der Mechanoadaptierung ihren Zellmetabolismus und ihren Zellphänotyp an die neuen mechanischen Bedingungen anpassen. Für AC hatten wir bereits gezeigt, dass sie auf das gewählte physiologische Belastungsprotokoll mit einem Erhalt bzw. einer Steigerung der Synthese von EZM-Molekülen reagieren. Diese wird durch den Beitrag verschiedener anaboler und kataboler Signalwege reguliert. Daher sollte der Einfluss mechanischer Belastung auf die Aktivität wichtiger Signalwege und die EZM-Synthese in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe untersucht werden.

4.4.1 Einfluss physiologischer Belastung auf die EZM-Synthese in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Ein Erhalt bzw. eine Steigerung der EZM-Synthese nach Belastung ist wichtig, um die Knorpelhomöostase aufrechtzuerhalten und das Gewebe an die neuen physikalischen Bedingungen anzupassen. Somit stellt die EZM-Synthese einen sehr wichtigen Bestandteil der Mechanoadaptierung von Knorpelgewebe dar, der hier als Hauptzielkriterium gewählt wurde. Um den Einfluss physiologischer Belastung auf den Zellmetabolismus anhand der EZM-Synthese in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu untersuchen, wurde die GAG- und Kollagenneusynthese mittels radioaktivem Isotopeneinbau über 24 h nach Belastungsende an Tag 21 und Tag 35 untersucht und auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert. In parallelen Proben wurde die belastungsinduzierte Expression der chondrogenen Markergene *ACAN* und *COL2A1* analysiert (Abbildung 17). Wie aus Vorarbeiten bekannt (Praxenthaler et al. 2018), reagierten AC auch in dieser Arbeit auf die physiologische Belastungsepisode mit einer Beibehaltung der GAG/DNA-Synthese an Tag 21 und einer Stimulation der GAG/DNA-Synthese

an Tag 35, während die Kollagensynthese durch die Belastung nicht reguliert war (Abbildung 17A). Interessanterweise führte dieselbe Belastungsepisode in MSC-basierten Chondrozyten zu einer signifikanten Reduktion der GAG-Synthese um $41 \pm 17 \%$ ($P=0.00001$) an Tag 21 und um $27 \pm 20 \%$ ($P=0.003$) an Tag 35 (Abbildung 17B). Die Kollagensynthese war in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 signifikant und an Tag 35 im Trend inhibiert. Ein Vergleich der basalen GAG-Syntheseraten zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten ergab weder einen signifikanten Unterschied an Tag 21 (Mittelwert AC: 24856 ± 12950 cpm/ μg DNA, MSC: 30979 ± 12714 cpm/ μg DNA, $P=0,34$, Daten nicht gezeigt), noch an Tag 35 (AC: 27641 ± 22980 cpm/ μg DNA, MSC: 29799 ± 10152 cpm/ μg DNA, $P=0,81$). Auch die basalen Kollagensyntheseraten unterschieden sich weder an Tag 21 (AC: 42637 ± 11151 cpm/ μg DNA, MSC: 35316 ± 5621 cpm/ μg DNA, $P=0,30$) noch an Tag 35 (AC: 42180 ± 7752 cpm/ μg DNA, MSC: 37177 ± 8009 cpm/ μg DNA, $P=0,37$) signifikant zwischen beiden Knorpelersatzgeweben. In AC wurde auf Genexpressionsebene keine signifikante belastungsinduzierte Regulation der *ACAN*- und *COL2A1*-Expression an Tag 21 und Tag 35 beobachtet (Abbildung 17C). MSC-basierte Chondrozyten reagierten auf die Belastung allerdings mit einer signifikanten Reduktion der *ACAN*-Expression an Tag 21 und der *COL2A1*-Expression an Tag 21 und 35 (Abbildung 17D).

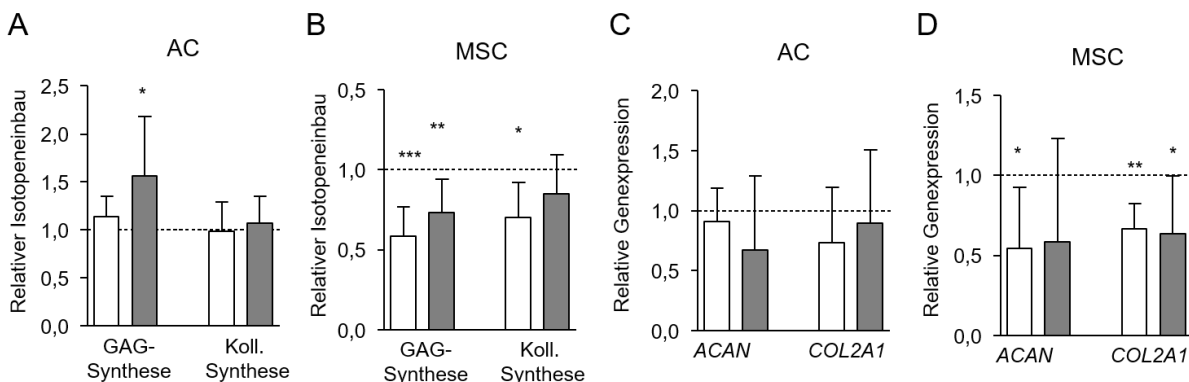


Abbildung 17. GAG- und Kollagensynthese in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nach Belastung. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 oder 35 Tage vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die GAG- und Kollagensynthese (A) AC und (B) MSC-basierter Chondrozyten wurde an Tag 21 (weiße Balken) und Tag 35 (graue Balken) durch Isotopeneinbau von $^{35}\text{SO}_4$ bzw. ^3H -Prolin über 24 h nach Belastung in belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen ermittelt und auf den mittels Pico Green Assay quantifizierten DNA-Gehalt der Proben normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 (gestrichelte Linie) gesetzt und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. (C) Die *ACAN*- und *COL2A1*-Expression in AC und (D) in MSC-basierten Chondrozyten wurde mittels qRT-PCR in belasteten Proben und in nicht-belasteten Kontrollen quantifiziert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, T-Test belastete Proben vs. nicht-belastete Kontrolle (n=3-10).

Also störte die dreistündige Belastung die EZM-Synthese MSC-basierter Chondrozyten, während sie in AC aufrechterhalten oder sogar gesteigert wurde. Somit zeigte MSC-basiertes

Knorpelersatzgewebe trotz gleicher Härtewerte, nur geringer Unterschiede in Mechano-transduktionsparametern und ähnlicher basaler EZM-Syntheseraten im Vergleich zu AC-basiertem Knorpelersatzgewebe Defizite in der Aufrechterhaltung der EZM-Synthese. Um die zugrundeliegenden molekularen Einflussfaktoren für diese unerwünschte Reaktion zu entschlüsseln, wurde nachfolgend die Regulation der anabolen TGF- β - und BMP-Signalwege nach Belastung untersucht.

4.4.2 Einfluss physiologischer Belastung auf die Aktivität anaboler Signalwege in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Es war bereits bekannt, dass sich in AC die belastungsinduzierte Stimulation von *BMP2* und *BMP6* nicht auf die pSMAD1/5/9-Spiegel überträgt. Auch die pSMAD2/3-Spiegel waren durch die Belastung nicht reguliert worden. Die Mechanoinduktion von *SOX9* war dagegen auch auf der Proteinebene sichtbar (Scholtes et al. 2018). Um zu prüfen, ob auch in MSC-basierten Chondrozyten trotz Mechanoinduktion von *BMP2* und *BMP6* keine Regulation der pSMAD1/5/9- und pSMAD2/3-Spiegel erfolgte, und ob sich die variable *SOX9*-Regulation auf Genexpressionsebene auch die Proteinebene übertrug, wurden unbelastete Kontrollen und belastete Proben von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 und Tag 35 mittels Western Blot analysiert.

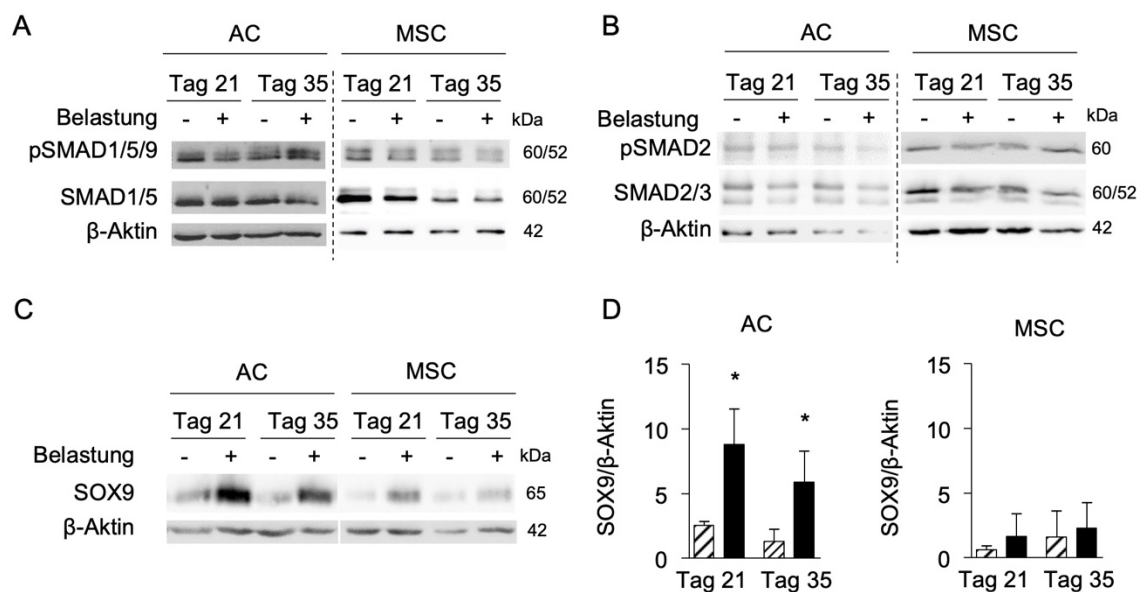


Abbildung 18. Proteinspiegel von pSMAD1/5/9, pSMAD2/3 und SOX9 in AC- und MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung an Tag 21 und 35. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 oder 35 Tage vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Proteinspiegel von **(A)** pSMAD1/5/9 und SMAD1/5, **(B)** pSMAD2/3 und SMAD2/3 und **(C)** SOX9 wurden in Ganzzelllysaten unbelasteter Kontrollen und belasteter Proben mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind je eine repräsentative AC- und MSC-Spenderpopulation ($n=3-4$). **(D)** Densitometrische Analyse der Western Blot Banden von SOX9 bezogen auf β -Aktin in unbelasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) AC- und MSC-basierter Chondrozyten an Tag 21 und Tag 35 (AC $n=3$, MSC $n=4$).

Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test belastete Proben vs. unbelastete Kontrollen.

Wie erwartet waren die pSMAD1/5/9-Spiegel an Tag 21 und Tag 35 in den drei untersuchten AC-Spenderpopulationen nicht durch die Belastung reguliert (Abbildung 18A). Wie AC wiesen auch MSC-basierte Chondrozyten trotz *BMP2*- und *BMP6*-Stimulation keine belastungsinduzierte Steigerung der pSMAD1/5/9-Spiegel auf. Auch der TGF- β -Signalweg, ermittelt anhand der pSMAD2/3-Spiegel (Abbildung 18B), zeigte keine belastungsinduzierte Aktivierung in AC und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 und Tag 35 an. Da der wichtige chondrogene Transkriptionsfaktor *SOX9* auf Genexpressionsebene in AC, aber nicht in MSC-basierten Chondrozyten signifikant durch die Belastung stimuliert war (Abbildung 14), wurden auch auf Proteinebene Unterschiede zwischen AC- und MSC-basierten Chondrozyten erwartet (Abbildung 18C). In der Tat ergab sich für AC an Tag 21 und 35 eine konsistente Stimulation der *SOX9*-Proteinspiegel durch Belastung (drei von drei Spenderpopulationen), während MSC-basierte Chondrozyten keine konsistente Regulation der *SOX9*-Proteinspiegel an Tag 21 zeigten. Zwei von vier MSC-Spenderpopulationen steigerten an Tag 21 *SOX9* nach Belastung, während eine Spenderpopulation die *SOX9*-Spiegel reduzierte und eine Population keine *SOX9*-Regulation durch die Belastung zeigte. An Tag 35 reagierten dann drei von vier MSC-Spenderpopulationen mit einer *SOX9*-Stimulation. Anhand einer densitometrischen Analyse der erhaltenen Western Blot Signale konnte eine signifikante belastungsinduzierte Steigerung der *SOX9*-Spiegel in AC sowohl an Tag 21 als auch an Tag 35 semiquantitativ bestätigt werden (Abbildung 18D). Für MSC-basierte Chondrozyten übertrug sich die inkonsistente Regulation der *SOX9*-Genexpression auch auf die Proteinebene.

Somit hatte die physiologische Belastung zwar keinen unmittelbaren Einfluss auf die Aktivität der anabolen TGF- β - und BMP-Signalwege, jedoch wurde der wichtige chondrogene Transkriptionsfaktor *SOX9* in AC stimuliert, während sich keine konsistente *SOX9*-Regulation in MSC-basierten Chondrozyten ergab.

Da in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe, anders als in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe, *SOX9* weniger stimuliert wurde und die EZM-Synthese nach Belastung reduziert war, sollten die zugrundeliegenden molekularen Einflussfaktoren für diese unerwünschten Reaktionen entschlüsselt werden. Dazu galt es, den Einfluss verschiedener anaboler und kataboler Signalwege zu analysieren. Ein wichtiger anaboler Signalweg, der die EZM-Synthese fördern kann, ist der BMP-Signalweg, der im nächsten Schritt untersucht wurde.

4.4.3 Der Einfluss des anabolen BMP-Signalwegs auf die EZM-Syntheserate von AC und MSC-basierten Chondrozyten

Die EZM-Synthese kann neben dem pro-chondrogenen TGF- β -Signalweg, der durch die Kulturbedingungen nachhaltig stimuliert wurde, auch durch weitere anabole Signalwege wie dem BMP-Signalweg gefördert werden. Wir wissen aus Vorarbeiten, dass der BMP-Signalweg neben dem TGF- β -Signalweg essenziell für die Ablagerung von Knorpelmatrix *in vitro* ist (Dexheimer et al. 2016). Zwar wurde die pSMAD1/5/9-Phosphorylierung durch die Belastung nicht erkennbar reguliert (Abbildung 18), dennoch könnte der BMP-Signalweg eine Rolle für die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten und AC spielen. Daher sollte geprüft werden, ob eine exogene Stimulation mit BMP6 die Defizite in der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung reduzieren und möglicherweise sogar einen AC-typischen Erhalt der EZM-Synthese etablieren kann. Ferner sollte geprüft werden, ob der BMP-Signalweg einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der EZM-Synthese nach Belastung in AC leistet also eine Inhibition des BMP-Signalwegs dazu führen würde, dass AC wie MSC-basierte Chondrozyten mit einer Reduktion der GAG-Synthese auf die Belastung reagieren.

Zunächst wurde für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 21 eine Stimulation mit 100 ng/mL rekombinantem humanem BMP6 ab 1 h vor Belastungsbeginn, während der Belastung und des Isotopeneinbaus, durchgeführt.

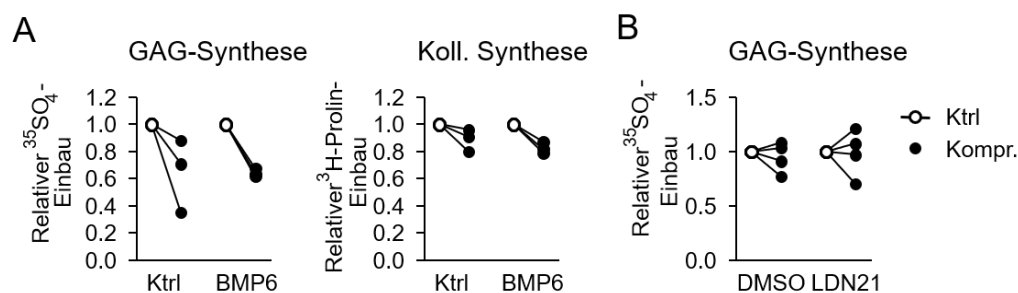


Abbildung 19. Einfluss des BMP-Signalwegs auf die belastungsinduzierte EZM-Synthese in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde 21 Tage lang vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Belastungsepisode belastet. **(A)** Belastungsinduzierte GAG-Synthese und Kollagensynthese in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe unter Verwendung von rekombinantem BMP6 (100 ng/mL) ab 1 h vor Belastungsstart, während der Belastung und während des 24-stündigen $^{35}\text{SO}_4^-$ bzw. ^3H -Prolineinbaus verglichen mit Standardbedingungen (n=3 Spenderpopulationen). Die GAG- und Kollagensynthese wurde in belasteten Proben (Kompr.) und nicht-belasteten Kontrollen (Ktrl) bestimmt und auf den DNA-Gehalt, ermittelt durch Pico Green Assay, normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. **(B)** Belastungsinduzierte GAG-Synthese in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe unter Inhibition des BMP-Signalwegs mittels 500 nM LDN212854 (LDN21) ab 21 h vor Belastungsstart, während der Belastung und während des 24-stündigen $^{35}\text{SO}_4^-$ -Einbaus verglichen mit der DMSO-Kontrolle (n=4 Spenderpopulationen). Die GAG-Synthese wurde in belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen bestimmt und auf den DNA-Gehalt, ermittelt durch Pico Green Assay, normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. * P<0.05, T-Test belastete Proben vs. unbelastete Kontrollen.

Alle drei untersuchten MSC-Spenderpopulationen reagierten mit einer Reduktion der GAG/DNA- und Kollagen/DNA-Synthese auf die Belastung im Kontrollmedium (Abbildung 19A). Auch in Anwesenheit von BMP6 war die GAG- und Kollagensynthese in allen drei untersuchten Spenderpopulationen reduziert. Somit konnte die BMP6-Stimulation weder die belastungsinduzierte Reduktion der GAG/DNA- noch die der Kollagen/DNA-Synthese abmildern. Weil die BMP6-Stimulation keine AC-typische Aufrechterhaltung der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten etablieren konnte, scheinen Defizite im BMP-Signalwege keine Rolle in der Verringerung der EZM-Synthese nach Belastung zu spielen.

Um zu prüfen, ob eine Inhibition des BMP-Signalwegs die GAG-Synthese unter Belastung reduzieren und somit eine MSC-typische Belastungsreaktion in AC-basierten Chondrozyten installieren kann, wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt, bei dem AC-basiertes Knorpelersatzgewebe ab 21 h vor Belastungsbeginn an Tag 21 mit dem BMP-Inhibitor LDN212854 (LDN21, 500 nM) behandelt wurde. In der DMSO-Gruppe zeigten dabei zwei Spenderpopulationen eine leichte belastungsinduzierte Erhöhung der GAG-Synthese, während zwei Spenderpopulationen mit einer Reduktion der GAG-Synthese reagierten (Abbildung 19B). Unter BMP-Inhibition mittels LDN21 reagierten ebenfalls zwei von vier Spenderpopulationen mit einer leichten Steigerung der GAG-Synthese unter Belastung, während die restlichen zwei Spenderpopulationen die GAG-Synthese reduzierten.

Somit hatte die BMP-Inhibition keinen Einfluss auf die belastungsinduzierte GAG-Synthese in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe und konnte keine MSC-typische belastungsinduzierte Reduktion der GAG-Synthese installieren. Folglich war der BMP-Signalweg kein limitierender Faktor für die EZM-Syntheseleistung der Zellen nach Belastung.

4.4.4 Untersuchung der Rolle kataboler Signalwege in AC und MSC-basierten Chondrozyten

Verschiedene katabole Signalwege können die Knorpelhomöostase beeinträchtigen und die EZM-Synthese stören. Da der anabole BMP-Signalweg keinen Beitrag zur unterschiedlichen Reaktion von AC und MSC-basierten Chondrozyten auf mechanische Belastung bezüglich der EZM-Synthese leistete, sollten als nächstes untersucht werden, ob verschiedene katabole Signalwege verstärkt in MSC-basierten Chondrozyten aktiviert sind und ob sie einen Beitrag zur reduzierten EZM-Synthese und zur variablen Regulation von SOX9 nach Belastung leisten. In den folgenden Abschnitten wurden der NF κ B-Signalweg und NO näher untersucht.

4.4.4.1 Rolle des NFκB-Signalwegs für die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten

Vergleich der NFκB-Spiegel zwischen AC- und MSC-basierten Chondrozyten

Um zu prüfen, ob unterschiedliche Aktivitäten des katabolen NFκB-Signalwegs in AC vs. MSC-basierten Chondrozyten vorlagen, die möglicherweise einen Einfluss auf die EZM-Synthese der Zellen haben könnten, wurden zunächst die Proteinspiegel der NFκB-Transkriptionsfaktoren p65, p50, p105 und cRel in AC- und MSC-basierten Chondrozyten in unbelasteten Kontrollen und belasteten Proben verglichen (Abbildung 20). Gemäß Western Blot Analyse hatte die Belastung in AC- und MSC-basierten Chondrozyten keinen Einfluss auf die p50, p105 und cRel-Spiegel. In MSC-basierten Chondrozyten war eine leichte Reduktion von aktivem p65 durch die Belastung erkennbar. Es konnte kein konsistenter Unterschied zwischen AC- und MSC-basierten Chondrozyten bezüglich der aktiven p65-, p50-, p105- und cRel-Spiegel in Ganzzelllysaten ermittelt werden. Allerdings wird die NFκB-Aktivität häufig anhand der Translokation in den Nukleus analysiert.

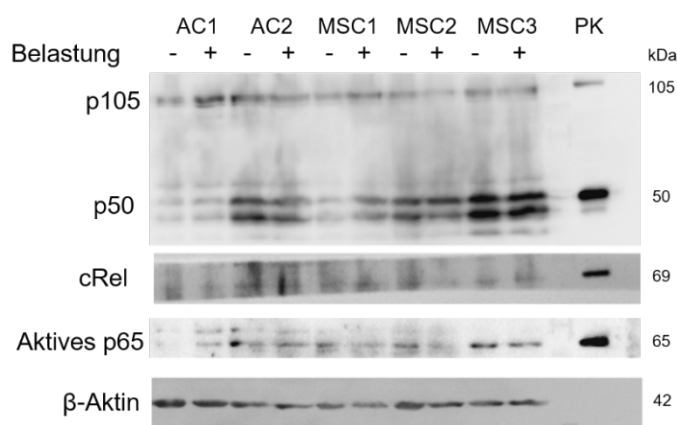


Abbildung 20. NFκB-Spiegel AC- und MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung an Tag 21. AC und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Spiegel von p50/p105, cRel und aktivem p65 wurden in Ganzzelllysaten von belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen in 2 AC-Spenderpopulationen (AC1-2) und 3 MSC-Spenderpopulationen (MSC1-3) mittels Western Blot analysiert. PK: Positivkontrolle (PMA-stimulierte (1 h, 0,1 μM) 143B Zelllysate). β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Eine vergleichende Analyse von NFκB in der Kernfraktion vs. der zytosolischen Fraktion könnte somit Erkenntnisse über die NFκB-Aktivität in AC und MSC-basierten Chondrozyten liefern. Somit lassen sich mit der gewählten Methode keine vollständigen Aussagen über die NFκB-Aktivität in AC und MSC-basierten Chondrozyten treffen. Durch eine gezielte Manipulation des NFκB-Signalwegs durch Agonisten und Antagonisten lässt sich dennoch untersuchen, ob der NFκB-Signalweg einen Beitrag zur reduzierten EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung leistet.

Effekt des NFκB-Agonisten IL-1β auf die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten

Um zu überprüfen, ob eine hohe NFκB-Aktivität mit einer niedrigen EZM-Synthese einhergeht, wurde eine Stimulation des NFκB-Signalwegs durch den bekannten NFκB-Agonisten IL-1β durchgeführt. Dazu wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe für 3 h mit 10 ng/mL IL-1β anstelle der Belastung behandelt und der Effekt auf die GAG- und Kollagensynthese vergleichend mit der Belastungsgruppe analysiert. Da PGE₂ als ein nachgeschalteter Mediator des NFκB-Signalwegs beschrieben ist, wurde die PGE₂-Freisetzung nach der dreistündigen Belastung bzw. der dreistündigen Stimulation mit IL-1β im konditionierten Medium von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 ermittelt.

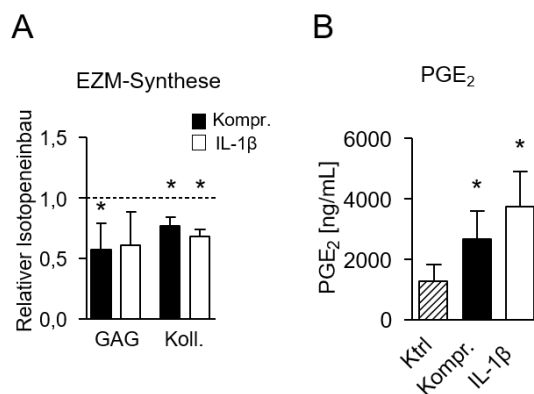


Abbildung 21. EZM-Synthese und PGE₂-Spiegel nach IL1-β-Stimulation in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Nach 21 Tagen Vorkultur wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe entweder mit dem dreistündigen Kompressionsprotokoll belastet oder für 3 h mit 10 ng/mL IL1-β stimuliert. **(A)** Die GAG-Synthese (GAG) wurde durch ³⁵SO₄-Einbau und die Kollagensynthese (Koll.) durch ³H-Prolineinbau über 24 h nach erfolgter Belastung bzw. Stimulation mit 10 ng/mL IL1-β in belasteten (Kompr., schwarze Balken), behandelten (IL1-β, weiße Balken), sowie nicht-belasteten, nicht-behandelten Kontrollen (Ktrl) quantifiziert und auf den DNA-Gehalt der Proben, ermittelt durch Pico Green Assay, normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. **(B)** Die PGE₂-Konzentration wurde im konditionierten Medium (20 h) nicht-belasteter Kontrollen, belasteter Proben sowie im konditionierten Medium von mit 10 ng/mL IL1-β behandelten Proben mittels ELISA quantifiziert. *P<0,05 T-Test, n=3-4.

MSC-basierte Chondrozyten reagierten auf die dreistündige Belastung mit einer signifikanten Reduktion der GAG- und Kollagensynthese (Abbildung 21A). Eine dreistündige Inkubation von IL-1β senkte die GAG-Synthese im Trend (Abbildung 21A) und inhibierte die Kollagensynthese signifikant. Interessanterweise war die PGE₂-Konzentration in der belasteten und in der mit IL-1β behandelten Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 21B). Somit simulierte der bekannte NFκB-Agonist IL1-β die belastungsinduzierte Reduktion der Kollagensynthese in MSC-basierten Chondrozyten und die Freisetzung des NFκB-Mediators PGE₂. Diese Daten könnten auf einen potenziellen Beitrag des NFκB-Signalwegs zur reduzierten EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung hindeuten, der im nächsten Schritt genauer untersucht wurde.

Effekt einer NFκB-Inhibition auf die belastungsinduzierte EZM-Synthese, SOX9-Spiegel und mechanosensitive Gene in MSC-basierten Chondrozyten

Um zu prüfen, ob NFκB-Signalweg an der reduzierten EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung beteiligt ist, wurde ein Inhibitionsexperiment mit dem gängigen NFκB-Inhibitor Bay11-7082 (Bay11) durchgeführt. Dazu wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe mit 0,75 μM Bay11 oder DMSO behandelt und an Tag 21 der dreistündigen Belastungsepisode unterzogen. Die Inhibition erfolgte ab 45 h vor Belastungsbeginn, während der Belastung und während des 24-stündigen Isotopeneinbaus. Nach Belastungsende wurden die EZM-Synthese, sowie die p65- und SOX9-Spiegel analysiert.

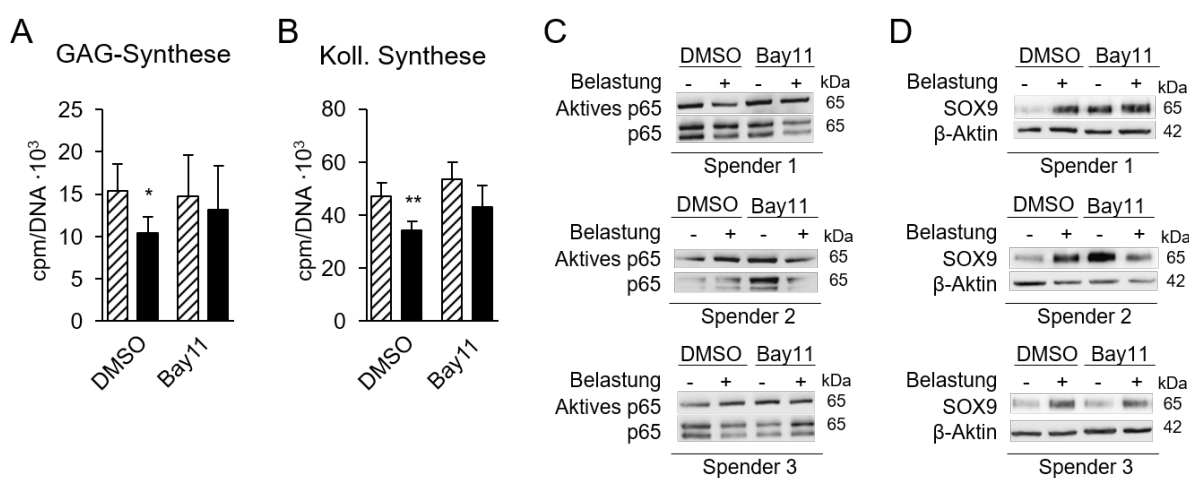


Abbildung 22. Einfluss der NFκB-Inhibition auf die EZM-Synthese, p65 und SOX9-Proteinspiegel in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vorkultiviert und ab 45 h vor Belastungsbeginn, während der Belastung und während des Isotopeneinbaus mit 0,75 μM Bay11-7082 (Bay11) bzw. DMSO behandelt und an Tag 21 mit dem dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokoll belastet. **(A)** Die GAG-Synthese wurde durch ³⁵SO₄-Einbau und **(B)** die Kollagensynthese (Koll. Synthese) wurde durch ³H-Prolineinbau über 24 h nach Belastungsende in mit DMSO oder Bay11-behandelten MSC-basierten Chondrozyten quantifiziert und auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert. Dargestellt sind die counts per minute (cpm)/DNA der unbelasteten Kontrollen (schraffiert) und der belasteten Proben (schwarz) (n=4). **(C)** Die aktiven p65-Proteinspiegel und Proteinspiegel des Gesamtproteins und **(D)** die SOX9-Proteinspiegel wurden in Ganzzelllysaten von mit DMSO- und Bay11 behandelten Belastungsproben und nicht-belasteten Kontrollen mittels Western Blot analysiert (n=3). β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

MSC-basierte Chondrozyten reagierten mit einer signifikanten Reduktion der GAG-Synthese in der DMSO-Gruppe (um 31 ± 12 %, P=0,037, Abbildung 22A). Die basale Syntheseleistung war unter NFκB-Inhibition mit Bay11 nicht verändert. Nach Belastung jedoch war die GAG-Synthese unter NFκB-Inhibition auf dem gleichen Niveau wie in den unbelasteten Kontrollen und es zeigte sich keine signifikante Reduktion der GAG-Synthese mehr. Auch die Kollagensynthese war in der DMSO-Gruppe signifikant durch die Belastung reduziert (Abbildung 22B). Ähnlich wie für die GAG-Synthese beobachtet, veränderte die NFκB-Inhibition die basale

Kollagensynthese in unbelasteten Kontrollen nicht. Nach Belastung wurde die Kollagensynthese unter NFκB-Inhibition jedoch anders als in der DMSO-Gruppe nicht mehr signifikant reduziert. Somit sanken die GAG- und Kollagensynthese in MSC-basierten Chondrozyten unter NFκB-Inhibition nicht mehr signifikant.

Die Western Blot Analyse zeigte in keiner der drei untersuchten Spenderpopulationen eine maßgebliche Änderung der Proteinspiegel von aktivem p65 durch Bay11 (Abbildung 22C). Wie bereits erwähnt könnte dies daran liegen, dass Ganzzelllysate analysiert wurden und nicht die Translokation von aktivem p65 in den Nukleus. Somit lässt sich anhand der p65-Spiegel keine Aussage über die NFκB-Aktivität treffen. Da dem NFκB-Signalweg eine inhibierende Wirkung auf SOX9 zugesprochen wird, wurden die SOX9-Spiegel unter NFκB-Inhibition vergleichend mit den DMSO-Kontrollen in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung und in unbelasteten Kontrollen ermittelt. Interessanterweise resultierte die NFκB-Inhibition durch Bay11 in einer deutlichen Steigerung der SOX9-Proteinspiegel in den unbelasteten Kontrollen in zwei von drei MSC-Spenderpopulationen, während eine Spenderpopulation keinen Effekt von Bay11 auf die basalen SOX9-Spiegel zeigte (Abbildung 22D). Die Belastung führte zu einer Stimulation der SOX9-Spiegel in der DMSO-Gruppe in allen drei Spenderpopulationen, während sich unter Bay11 eine inkonsistente Regulation der SOX9-Spiegel ergab. Dabei zeigten zwei von drei Spenderpopulationen eine Stimulation von SOX9 nach Belastung unter Bay 11, während eine Spenderpopulation mit einer Reduktion von SOX9 auf die Belastung reagierte.

Somit wurden negative Effekte auf die EZM-Synthese durch Belastung in MSC-basierten Chondrozyten unter NFκB-Inhibition deutlich abgemildert. Die robuste AC-typische Stimulation von SOX9 durch Belastung wurde jedoch nicht installiert. Also leistete der NFκB-Signalweg einen relevanten negativen Beitrag zur EZM-Synthese von MSC-basierten Chondrozyten unter Belastung, jedoch wurde eine Regulation von SOX9 wie in AC nicht installiert.

In der Literatur wurden unter anderem die mechanosensitiven Gene *FOS*, *COX2* und *BMP2* als Zielgene des NFκB-Signalwegs beschrieben. Um zu prüfen, ob der NFκB-Signalweg nicht nur an der EZM-Synthese beteiligt ist, die in dieser Arbeit das Hauptzielkriterium der Mechanoadaptierung darstellt, sondern womöglich auch die Expression mechanosensitiver Gene beeinflussen kann, die ein wichtiger Aspekt der Mechanotransduktion sind, wurde die belastungsinduzierte Expression ausgewählter mechanosensitiver Gene in MSC-basierten Chondrozyten unter NFκB-Inhibition durch 0,75 μM Bay11-7082 im Vergleich zur DMSO-Gruppe mittels qRT-PCR analysiert. Gleichzeitig wurde geprüft, ob die durch NFκB-Inhibition abgeschwächte Senkung der GAG- und Kollagensynthese auch mit einer Elimination der belastungsinduzierten Reduktion der *ACAN*- und *COL2A1*-Expression einherging.

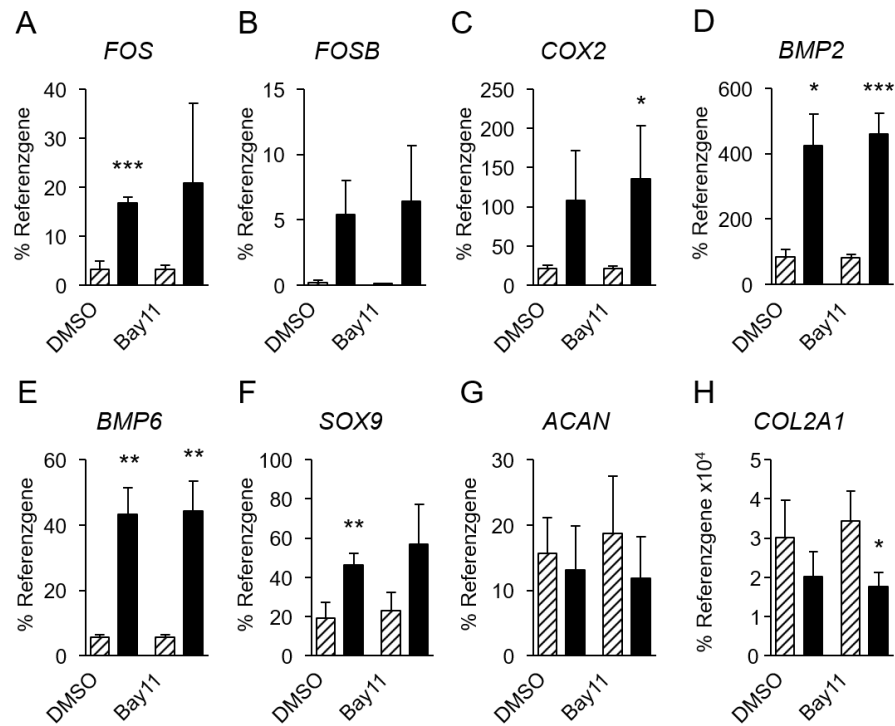


Abbildung 23. Einfluss der NFκB-Inhibition auf die Expression mechanosensitiver Gene und chondrogener Marker in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung. Nach 21 Tagen Vorkultur wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe 45 h vor Belastungsbeginn mit 0,75 μM Bay11-7082 oder DMSO vorbehandelt und mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Genexpression der mechanosensitiven Gene (A) *FOS*, (B) *FOSB*, (C) *COX2*, (D) *BMP2*, (E) *BMP6* und (F) *SOX9* und der chondrogenen Marker (G) *ACAN* und (H) *COL2A1* wurde in nicht-belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) mittels qRT-PCR ermittelt. *CPSF6* und *HNRPH1* wurden als Referenzgene verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von drei Spenderpopulationen (n=3). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 T-Test belastet vs. Kontrolle.

Unter NFκB-Inhibition durch Bay11 zeigten MSC-basierte Chondrozyten dieselben basalen Expressionsspiegel der gewählten mechanosensitiven Gene *FOS*, *FOSB*, *COX2*, *BMP2*, *BMP6* und *SOX9* (Abbildung 23A-F), sowie der chondrogenen Marker *ACAN* und *COL2A1* (Abbildung 23G, H). Auch nach Belastung war die Expression der analysierten mechanosensitiven Gene zwischen der Bay11 und der DMSO-Gruppe nicht unterschiedlich und das belastungsinduzierte Expressionsprofil beider Gruppen war ähnlich (Abbildung 23A-F). Auch für *ACAN* und *COL2A1* wurden nach Belastung unter Bay11 dieselben Expressionsspiegel wie in der DMSO-Gruppe beobachtet (Abbildung 23G, H).

Somit ist der NFκB-Signalweg nicht Teil der belastungsinduzierten Stimulation der untersuchten mechanosensitiven Gene.

Zusammenfassend simulierte eine Stimulation mit dem NFκB-Agonisten IL-1β die belastungsinduzierte Reduktion der Kollagensynthese und eine Inhibition des NFκB-Signalwegs erlaubte es den MSC-basierten Chondrozyten, die EZM-Synthese nach mechanischer Belastung an Tag 21 beizubehalten. Obwohl die Inhibition die aktiven p65-Spiegel nicht reduzierte, wurden die *SOX9*-Spiegel unter NFκB-Inhibition erhöht. Allerdings war die *SOX9*-Regulation nach

Belastung auch unter NFκB-Inhibition variabel und es zeigte sich kein Effekt auf die Regulation mechanosensitiver Gene. Somit war der NFκB-Signalweg maßgeblich an der belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten beteiligt, jedoch nicht an der Regulation von SOX9 und der mechanosensitiven Gene.

4.4.4.2 Vergleich der NO-Freisetzung aus AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

NO ist ein bekanntes mechanosensitives aktives Molekül, das katabole Effekte im Knorpel auslösen kann. Da MSC-basierte Chondrozyten anders als AC mit einer katabolen Antwort auf mechanische Belastung bezüglich der EZM-Synthese reagierten, sollte geprüft werden, ob höhere Spiegel von NO in MSC-basierten Chondrozyten versus AC vorlagen. Daher wurde die Nitritkonzentration als stabiles Endprodukt des hochreaktiven NO im konditionierten Medium belasteter und nicht-belasteter Proben von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe mittels Griess-Reaktion an Tag 21 untersucht.

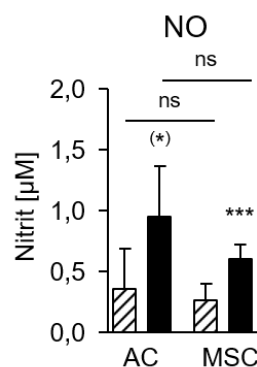


Abbildung 24. Nitritkonzentration im konditionierten Medium von AC und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nach Belastung. AC- und MSC-basierten Knorpelersatzgewebe wurde nach 21 Tagen Vorkultur mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Nitritkonzentrationen als stabiles Endprodukt des produzierten NO wurde mittels Griess Reaktion im konditionierten Medium (20 h) nicht-belasteter Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteter Proben (schwarze Balken) quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 6 AC- und 9 MSC-Spenderpopulationen (n=6-9). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 T-Test belastet vs. Kontrolle; ns P>0.05, T-Test AC vs. MSC.

Die Nitritkonzentration im konditionierten Medium von AC- versus MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-belasteten Kontrollen (Abbildung 24). Auch nach Belastung ergab sich kein signifikanter Unterschied der Nitritkonzentration zwischen den beiden Gruppen und beide reagierten auf die Belastung mit einer signifikanten Steigerung der Nitritkonzentration, wobei diese für AC nach Bonferroni-Korrektur für multiple statistische Vergleiche nur noch im Trend erhöht war.

Somit bestand kein signifikanter Unterschied in der NO-Freisetzung aus AC- und MSC-basierten Chondrozyten. Daher lag kein Hinweis auf einen möglichen Beitrag von NO an der

belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten vor, weshalb NO nicht weiter untersucht wurde.

4.4.5 Untersuchung des Einflusses mechanischer Belastung auf Signale mit anaboler und kataboler Wirkung

4.4.5.1 Vergleich der PGE₂-Freisetzung aus AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Ein mechanosensitiver Signalweg, dem je nach Zelltyp und Kulturbedingungen anabole, neutrale oder katabole Wirkungen zugesprochen werden, ist der COX2/PGE₂-Signalweg. Da nur MSC-basierte Chondrozyten mit einer katabolen Antwort auf mechanische Belastung bezüglich der EZM-Synthese reagierten, während AC diese an Tag 21 beibehielten, sollte geprüft werden, ob höhere PGE₂-Spiegel in MSC-basierten Chondrozyten vs. AC vorlagen. Dazu wurde die PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium von nicht-belasteten Kontrollen und belasteten Proben von AC- und MSC-basierten Chondrozyten mittels ELISA verglichen.

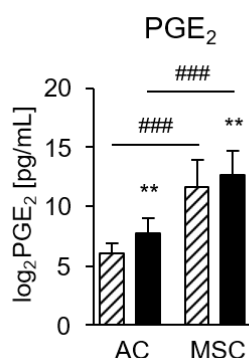


Abbildung 25. PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nach Belastung. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vorkultiviert und einer dreistündigen Belastungsepisode unterzogen. Die PGE₂-Konzentration wurde im konditionierten Medium (20 h) unbelasteter Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteter Proben (schwarze Balken) mittels ELISA quantifiziert. Die PGE₂-Konzentrationen sind als Mittelwerte + Standardabweichung von 6 AC- und 9 MSC-Spenderpopulationen dargestellt (n=6-9). Um die sehr hohen Unterschiede zwischen AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe in einer Grafik besser visualisieren zu können, wurde die PGE₂-Konzentration als log₂ dargestellt. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 T-Test belastete Proben vs. Kontrolle. ###P<0,001, T-Test AC- vs. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe.

Passend zu der beobachteten belastungsinduzierten Stimulation der Expression von COX2 (Abbildung 15) ein Protein, das an der Synthese von PGE₂ beteiligt ist, zeigte sich auch eine signifikante Steigerung der PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 nach Belastung (Abbildung 25). Passend zum höheren basalen Expressionsspiegel von COX2 in MSC-basierten Chondrozyten versus AC an Tag 21 (Abbildung 15) war auch PGE₂ im konditionierten Medium von MSC-basiertem

Knorpelersatzgewebe signifikant höher (138-fach, Mittelwert) (Abbildung 25). Da sich die basale EZM-Syntheseleistung zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten aber nicht unterschied (Abschnitt 4.4.1), gab es keine Hinweise darauf, dass PGE₂ die EZM-Synthese substantiell beeinflusste. Daher wurde ein Einfluss von PGE₂ auf die EZM-Synthese nicht weiterführend untersucht.

Da in der Literatur solch gravierende PGE₂-Konzentrationsunterschiede zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten unter gleichen Bedingungen bislang nicht beschrieben waren, stellte sich die Frage, ob diese möglicherweise durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen auf den hier verwendeten Kollagen I/III-Träger und das β -TCP-Knochenersatzmaterial bedingt sein könnten. Um einen Effekt der Trägermaterialien auszuschließen, wurde geprüft, ob AC und MSC-basierte Chondrozyten auch in der trägerlosen Pelletkultur *in vitro* unterschiedliche PGE₂-Spiegel aufweisen. Dazu wurde die PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium von AC und MSC-basierten Chondrozyten in Pelletkultur an Tag 7, 14, 21, 28 und 35 quantifiziert (Abbildung 26).

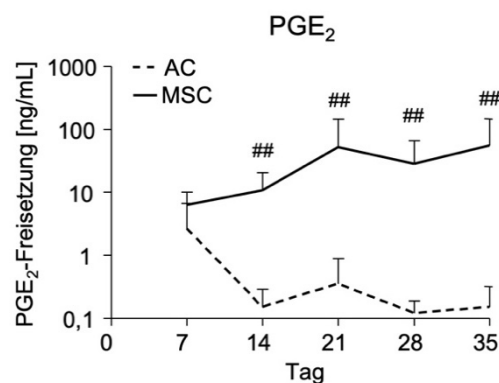


Abbildung 26. PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium von AC und MSC in Pelletkultur im Zeitverlauf. AC und MSC wurden als Pellets für bis zu 35 Tage kultiviert und die PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium (2 Tage) von AC (gestrichelte Linie) und MSC-basierten Chondrozyten (durchgezogene Linie) an Tag 7, 14, 21, 28 und 35 mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von je 6 Spenderpopulationen. ##P<0,01, Mann-Whitney-U-Test AC vs. MSC, n=6.

Auch in Pelletkultur wurden signifikant höhere PGE₂-Konzentrationen im konditionierten Medium von MSC-basierten Chondrozyten verglichen mit AC ab Tag 14 beobachtet. Da MSC-basierte Chondrozyten ebenso wie AC in der Lage sind, gleiche Mengen von GAG und Kollagen Typ II unter chondrogenen Bedingungen abzulagern, stellt dies einen wichtigen Hinweis darauf dar, dass PGE₂ die Stärke der EZM-Produktion nicht maßgeblich bestimmt. Somit sind erhöhte PGE₂-Spiegel ein MSC-typisches Charakteristikum, das nicht durch den verwendeten Kollagen I/III-Träger und β -TCP bedingt war. Demzufolge sollten eher andere Signalwege die Reduktion der EZM-Synthese nach Belastung in MSC-basierten Chondrozyten bedingen.

4.4.5.2 Der Beitrag des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs zur EZM-Synthese von MSC-basierten Chondrozyten

Eine Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs kann je nach Anwendungsprotokoll pro-chondrogene (Fischer et al. 2014) oder anti-chondrogene (Fischer et al. 2014; Mueller et al. 2013; Weiss et al. 2010) Effekte auf die Differenzierung von MSC *in vitro* haben kann. Daher sollte die Rolle des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs in MSC-basierten Chondrozyten vs. AC näher zu untersucht, seine Stimulierbarkeit durch Belastung geprüft und ein möglicher Beitrag zur belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten entschlüsselt werden.

Vergleich der *PTH LH*-Expression in AC vs. MSC-basierten Chondrozyten

Um zu prüfen, ob AC und MSC-basierte Chondrozyten in Knorpelersatzgewebe Unterschiede in der basalen *PTH LH*-Expression aufweisen und ob *PTH LH* durch die Belastung reguliert wird, wurden die *PTH LH*-Expressionsspiegel in belasteten Proben und nicht-belasteten Kontrollen von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe mittels qRT-PCR analysiert.

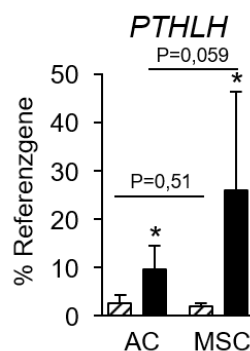


Abbildung 27. *PTH LH*-Expression in AC- und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 nach Belastung. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde 21 Tage vorkultiviert und anschließend mit der dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die *PTH LH*-Expression in nicht belasteten Kontrollen (schraffierte Balken) und belasteten Proben (schwarze Balken) wurde mittels qRT-PCR analysiert. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von n=5 AC- und n=7 MSC-Donorpopulationen. * $P \leq 0,05$, T-Test belastet vs. Kontrolle.

AC und MSC-basierte Chondrozyten zeigten an Tag 21 die gleichen basalen *PTH LH*-Expressionsspiegel (Abbildung 27). Die dreistündige Belastung stimulierte die Expression von *PTH LH* signifikant in AC um das 5,6-fache und in MSC-basierten Chondrozyten um das 14,5-fache. Nach Belastung zeigten sich im Trend 2,7-fach höhere *PTH LH*-Expressionsspiegel in MSC-basierten Chondrozyten im Vergleich zu AC ($P=0,059$). Aufgrund einer hohen Varianz in den belasteten Proben der MSC-Gruppe wurden jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zur belasteten AC-Gruppe erreicht.

Da PTHrP die Differenzierung je nach Anwendung fördern oder inhibieren kann, könnte die belastungsinduzierte *PTH LH*-Expression auf einen möglichen Einfluss von PTHrP auf die EZM-Synthese nach Belastung hindeuten, sollte sich die belastungsinduzierte Stimulation von PTHrP auch auf Proteinebene ergeben. In unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene Methoden zur (semi)quantitativen Analyse von PTHrP auf Proteinebene intensiv getestet. Weder mittels Western Blot Analyse, noch mittels PTHrP-ELISA oder Radioimmunassay konnte PTHrP auf Proteinebene in Knorpelersatzgewebe oder konditioniertem Medium detektiert werden. Da der PTHrP-Signalweg vorwiegend über die nachgeschaltete cAMP/PKA-Aktivierung verläuft, kann die cAMP-Konzentration nach Belastung einen Hinweis darauf geben, ob der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg durch die Belastung stimuliert wurde. Um herauszufinden, ob eine belastungsinduzierte Stimulation der *PTH LH*-Expression mit einer Steigerung des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs einhergeht, wurde im nächsten Schritt die cAMP-Konzentration in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung untersucht.

Analyse der belastungsinduzierten cAMP-Spiegel in MSC-basierten Chondrozyten

Um eine belastungsinduzierte Stimulation des Second Messengers cAMP in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 erstmalig zu prüfen, wurde die Endkonzentration von cAMP nach Ende der Belastung mittels ELISA in Ganzzelllysaten bestimmt. Als Positivkontrollen wurden Lysate von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe verwendet, welches für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 10 μ M Forskolin, einem Aktivator der Adenylylcyclase, stimuliert wurde.

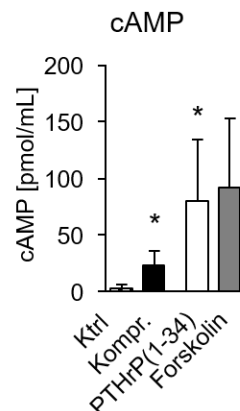


Abbildung 28. cAMP Konzentration in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung oder PTHrP(1-34) Stimulation an Tag 21. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vorkultiviert und anschließend entweder mit dem dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokoll belastet oder für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde in Ganzzelllysaten unbelasteter Kontrollen, belasteter Proben und nach dreistündiger Stimulation mit PTHrP(1-34) mittels ELISA analysiert. Eine Stimulation mit 10 μ M Forskolin wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von 4-5 MSC-Spenderpopulationen. * $P < 0,05$, T-Test belastete oder behandelte Proben vs. unbelastete, unbehandelte Kontrolle, $n = 4-5$.

In der Tat stimulierte die Belastung die cAMP-Produktion im Mittel um das Neunfache, ein Effekt, der statistisch signifikant war ($P=0,011$, Abbildung 28). Auch die Stimulation mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) führte zu einer signifikanten Stimulation der cAMP-Konzentration ($P=0,032$). Für die Forskolin-Gruppe ergab sich jedoch aufgrund einer hohen Variabilität bei niedriger Fallzahl ($n=4$) nur im Trend eine Stimulation der cAMP-Konzentration ($P=0,062$). Also steigerte die Belastung nicht nur die *PTHLLH*-Expression, sondern auch die cAMP-Produktion in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21. Somit konnte für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe erstmals eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs nach zyklischer Kompression gezeigt werden. Da PTHrP die Differenzierung und somit die EZM-Synthese von MSC-basierten Chondrozyten bei konstanter Anwendung inhibieren und unter gepulster Anwendung stimulieren kann, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob eine einmalige dreistündige Stimulation mit PTHrP(1-34) auch einen Einfluss auf die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten hat.

Einfluss einer Stimulation mit PTHrP(1-34) auf die EZM-Synthese und mechanosensitive Gene in MSC-basierten Chondrozyten

Um zu prüfen, ob der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach einmaliger dreistündiger Anwendung regulieren kann, wurden die Proben an Tag 21 für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) stimuliert. Parallel mitgeführte Proben blieben unbehandelt (Kontrolle) oder wurden in Abwesenheit von PTHrP(1-34) belastet. Da eine einmalige dreistündige Stimulation mit PTHrP(1-34) und keine gepulste Anwendung erfolgte, wurde erwartet, dass der Effekt von PTHrP(1-34) dem einer konstanten Applikation entsprach. Demnach wurde eine Reduktion der EZM-Synthese durch die dreistündige Stimulation mit PTHrP(1-34) erwartet.

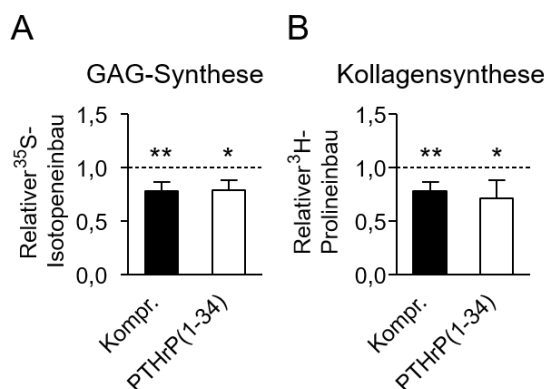


Abbildung 29. Einfluss der PTHrP(1-34)-Stimulation auf die EZM-Synthese in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. (A) GAG- und (B) Kollagensynthese in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 nach Belastung (Kompr.) oder dreistündiger Stimulation mit 10 ng/mL PTHrP(1-34). Die GAG-Synthese wurde mittels $^{35}\text{SO}_4$ -Isotopeneinbaus und die Kollagensynthese mittels ^3H -Prolineinbaus über 24 h nach Belastung bzw. Behandlung in Kontrollen, belasteten Proben oder mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) behandelten Proben quantifiziert und auf den DNA-Gehalt, ermittelt durch Pico Green Assay, normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie)

und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. * $P < 0,05$, T-Test Belastung bzw. Behandlung vs. Kontrolle, $n = 3-4$ Spenderpopulationen.

In der Tat führte die dreistündige Stimulation mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) (um $21 \pm 8 \%$, $P = 0,022$), ähnlich wie mechanische Belastung (um $22 \pm 7 \%$, $P = 0,002$, $n = 4$), zu einer signifikanten Inhibition der GAG-Synthese (Abbildung 29A). Auch die Kollagensynthese wurde sowohl durch mechanische Belastung (um $21 \pm 7 \%$, $P = 0,002$, $n = 3$) als auch durch die PTHrP(1-34)-Behandlung signifikant reduziert (um $29 \pm 24 \%$, $P = 0,044$, Abbildung 29B).

Somit senkte eine Stimulation mit 10 ng/mL exogenem PTHrP(1-34) für 3 Stunden die GAG- und Kollagensynthese um ein ähnliches Ausmaß wie die Belastungsepisode, was auf einen potenziellen Beitrag des PTHrP-Signalwegs an der belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese hindeuten könnte.

Um zu prüfen, ob erhöhte exogene PTHrP(1-34)-Spiegel in MSC-basierten Chondrozyten nicht nur die EZM-Synthese als Hauptzielkriterium der Mechanoadaptation, sondern möglicherweise auch die mechanoregulierten Gene als wichtige Mechanotransduktionsparameter imitieren könnten, wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 21 entweder für 3 Stunden belastet oder mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) behandelt und vergleichend mit nicht-behandelten, nicht-belasteten Kontrollen mittels qRT-PCR analysiert. Des Weiteren wurde eine Gruppe mit 1 mM des synthetischen cAMP-Analogs dbcAMP für drei Stunden ohne Belastung mitgeführt, um zu prüfen, ob eine erhöhte Konzentration dieses nachgeschalteten Mediators dieselben Effekte wie PTHrP(1-34) auf die Expression der mechanosensitiven Gene hat.

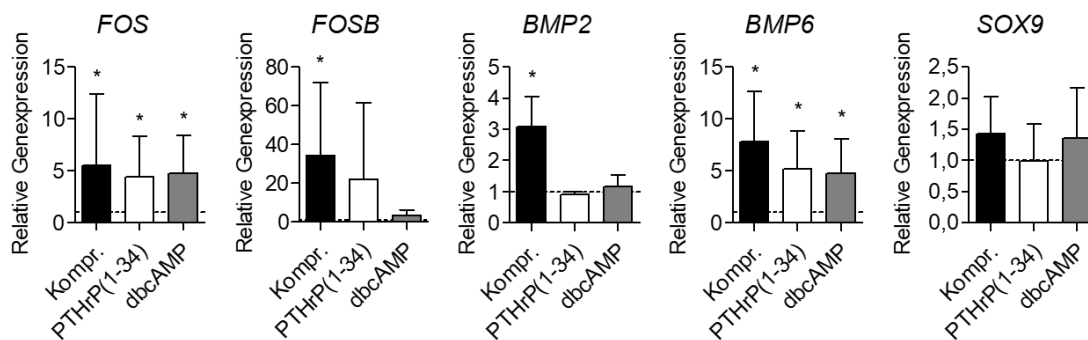


Abbildung 30. Einfluss von PTHrP(1-34) oder dbcAMP auf die Expression mechanosensitiver Gene in MSC-basierten Chondrozyten. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vor-kultiviert und anschließend dem dreistündigen Belastungsprotokoll unterzogen oder für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 1 mM dbcAMP behandelt. Die Genexpression mechanosensitiver Gene in nicht-belasteten Kontrollen, belasteten Proben (Kompr.) sowie mit PTHrP(1-34) oder dbcAMP stimulierten Proben wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die nicht-belasteten, nicht-behandelten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung, $N = 4-8$. * $P < 0,05$ MWU belastete bzw. behandelte Proben vs. Nicht-belastete, nicht-behandelte Kontrollen.

Die Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs mittels 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 1 mM dbcAMP führte, ähnlich wie die Belastung, zu einer signifikanten Induktion der Expression der mechanosensitiven Gene *FOS* und *BMP6*. Anders als bei der Belastung erfolgte keine Regulation der mechanosensitiven Gene *FOSB* und *BMP2* durch die Behandlung mit PTHrP(1-34) oder dbcAMP, während *SOX9* bei keiner Behandlungs- bzw. Belastungsgruppe reguliert war. Somit löste die Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs eine Induktion von *FOS* und *BMP6* aus, nicht aber die weiterer mechanosensitiver Gene. Dies weist darauf hin, dass der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg ein Teil der Mechanotransduktion MSC-basierter Chondrozyten sein könnte.

Um einen kausalen Beitrag des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs an der reduzierten EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten zu überprüfen, wurde nachfolgend eine Inhibition des PTH-Rezeptors durchgeführt.

Einfluss einer Inhibition des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs auf die EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten

Die durch PTHrP(1-34) imitierte Senkung der GAG-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten deutet an, dass der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg einen Beitrag zur Reduktion der GAG-Synthese durch Belastung leisten könnte. Um dies zu überprüfen wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen Inhibitoren des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs durchgeführt. Dazu wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 21 zunächst mit dem gängigen PTH-Rezeptor-Inhibitor PTHrP(7-34) in einer Konzentration von 1 μ M eine Stunde vor, während der Belastung und während des Isotopeneinbaus behandelt und die GAG-Synthese pro DNA über 24 h nach Belastungsende analysiert.

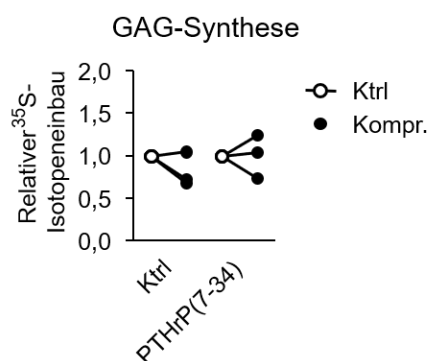


Abbildung 31. GAG-Synthese unter PTHrP-Inhibition mit PTHrP(7-34) in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 Tage vorkultiviert und anschließend mit dem dreistündigen zyklischen Kompressionsprotokoll bei 1 μ M PTHrP(7-34) oder im Kontrollmedium belastet. Die PTHrP(7-34)-Inkubation erfolgte eine Stunde vor Belastungsbeginn, während der Belastung und während des Isotopeneinbaus. Dargestellt ist der relative ³⁵S-Einbau

normalisiert auf den DNA-Gehalt der Proben ermittelt durch Pico Green Assay. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (weißer Kreis, n=3) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen.

Anders als erwartet reagierte eine von drei Spenderpopulationen im Kontrollmedium nicht mit einer typischen belastungsinduzierten Reduktion der GAG-Synthese, die bei den anderen zwei Spenderpopulationen beobachtet wurde. Die typische belastungsinduzierte Inhibition der GAG-Synthese konnte jedoch in zwei von drei Spenderpopulationen durch die Inhibition des PTHrP-Signalwegs eliminiert werden (Abbildung 31). Da aber aus Vorarbeiten bekannt ist, dass PTHrP(7-34) oftmals keine zufriedenstellende Inhibition des PTHrP-Signalwegs ermöglicht, wurden im Folgenden weitere alternative Inhibitoren des cAMP/PKA-Signalwegs getestet, um einen Beitrag des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs an der belastungsinduzierten Reduktion der GAG-Synthese zu prüfen.

Um den Einfluss des cAMP/PKA-Signalwegs auf die belastungsinduzierte EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten näher zu untersuchen, wurde als Alternative zu PTHrP(7-34) der gängige PKA-Inhibitor H89 getestet. Um zu prüfen, ob H89 ein geeigneter Inhibitor für die Analyse PTHrP-vermittelter Effekte ist, wurde ein Pilotexperiment mit 10 μ M und 20 μ M H89 durchgeführt (n=2). Dabei wurde untersucht, ob H89 einer Inhibition der Expression des aus der Wachstumsfuge bekannten PTHrP-Zielgens *IHH* durch PTHrP(1-34) entgegenwirken kann. MSC in Pelletkultur wurden dazu an Tag 14 mit 10 μ M oder 20 μ M H89 für 1 h vorbehandelt und anschließend für weitere 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) stimuliert. Die Proben wurden mittels qRT-PCR analysiert. Beide verwendeten Konzentrationen von H89 zeigten in Kombination mit PTHrP(1-34) die gleiche Reduktion der *IHH*-Expression wie PTHrP(1-34) alleine (Abbildung 32). Folglich konnten die gewählten H89-Konzentration die PTHrP(1-34)-vermittelte Inhibition der *IHH*-Expression nicht abmildern und H89 wurde in den getesteten Konzentrationen als ungeeigneter Inhibitor für die Verwendung in Belastungsexperimenten bewertet.

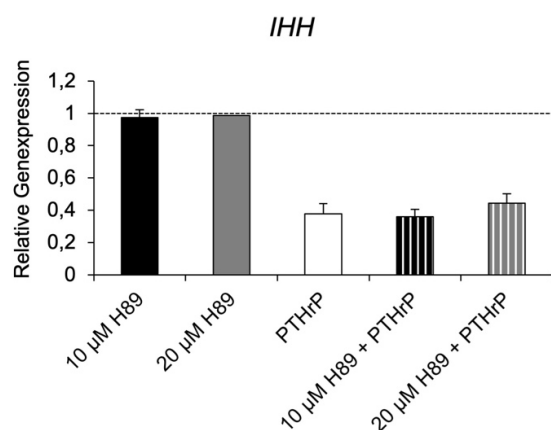


Abbildung 32. Austestung der H89-Wirkung in MSC-Pellets an Tag 14. MSC wurden 14 Tage in Pelletkultur kultiviert und anschließend für 1 h mit 10 μ M oder 20 μ M H89 vorbehandelt und mit 10 ng/mL

PTHrP(1-34) für weitere 3 h stimuliert. Die Genexpression von *IHH* wurde mittels qRT-PCR in unbehandelten Kontrollen, in mit H89 behandelten (10, 20 μM), in mit PTHrP(1-34) behandelten und in mit H89 und PTHrP(1-34) behandelten Proben analysiert. Die nicht-behandelten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörigen behandelten Proben darauf bezogen. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet ($n=2$).

Eine Erhöhung der H89-Konzentration auf 100 μM in einem Pilotversuch mit MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21, wobei H89 2 h vor Belastungsbeginn angewandt wurde, veränderte die Expression der gewählten Referenzgene, so dass eine toxische Wirkung von H89 in der gewählten Konzentration nicht ausgeschlossen werden konnte ($n=1$, Daten nicht gezeigt). Somit war H89 unter den verwendeten Bedingungen kein geeigneter Inhibitor für den cAMP/PKA-Signalweg in MSC-basierten Chondrozyten.

Ein weiterer Inhibitor, der den cAMP/PKA-Signalweg an anderer Stelle inhibiert, ist MDL-12,330A (MDL), ein gängiger Adenylylcyclase-Inhibitor. MDL bindet die Adenylylcyclase und inhibiert somit die Produktion von cAMP. In einer ersten Konzentrationsauswertung wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe von zwei Spenderpopulationen an Tag 21 zunächst für 30 min mit 1 mM IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor zur Stabilisation von cAMP, sowie mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und 50 μM MDL behandelt. Anschließend wurde eine Gruppe mit 10 μM Forskolin und eine Gruppe mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) für weitere 3 h co-stimuliert, um zu prüfen, ob MDL-12,330A effektiv einer Aktivierung der Adenylylcyclase entgegenwirken kann.

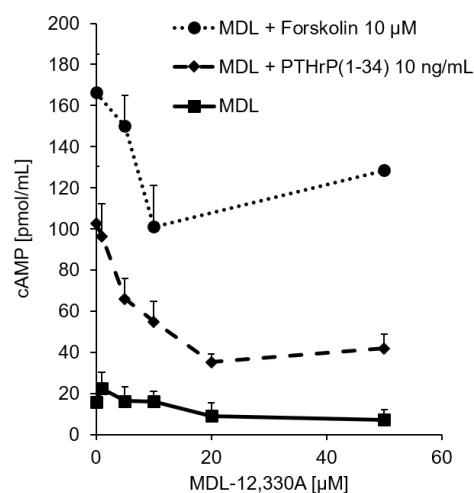


Abbildung 33. cAMP-Konzentration unter Adenylylcyclaseinhibition in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Nach einer Vorkultur von 21 Tagen wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe für 3 h mit steigenden MDL-12,330A (MDL)-Konzentrationen nach vorheriger 30-minütiger Inkubation mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 10 μM Forskolin zusammen mit 1 mM IBMX. Die cAMP-Konzentration wurde in Ganzzelllysaten mittels ELISA analysiert ($n=2$).

Es ergab sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Forskolin- und der PTHrP(1-34)-induzierten cAMP-Stimulation, die für Forskolin den stärksten Effekt bei 10 μM MDL aufwies (Abbildung 33). Eine Steigerung auf 50 μM MDL zeigte keine weitere Reduktion der cAMP-Konzentration. Die stärkste Senkung der PTHrP(1-34)-induzierten cAMP-Konzentration wurde mit 20 μM MDL erreicht. Dabei war die PTHrP(1-34)-induzierte cAMP-Konzentration um 62 % von $102,9 \pm 27,6$ auf $35,3 \pm 4,0$ pmol/mL cAMP reduziert. Eine Erhöhung der Konzentration auf 50 μM MDL-12,330A zeigte keine weitere Reduktion der cAMP-Konzentration. Da die stärkste Reduktion der PTHrP(1-34)-induzierten cAMP-Konzentration mit 20 μM MDL-12,330A erreicht wurde, wurde diese Konzentration für die Adenylylcyclase-Inhibition unter Belastung von MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 verwendet.

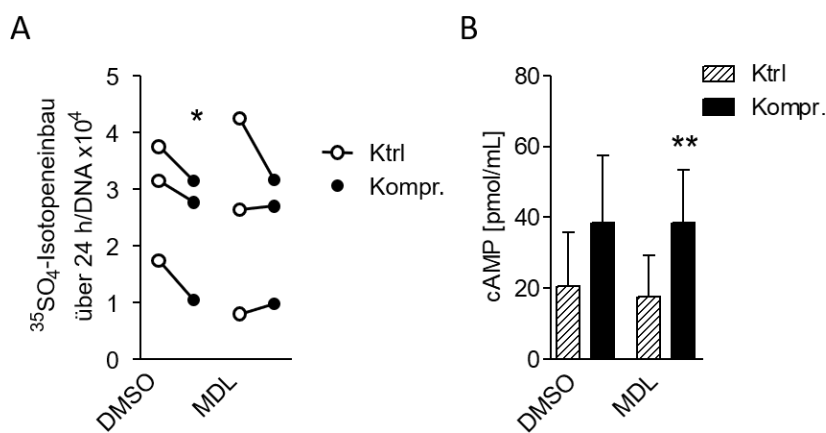


Abbildung 34. Einfluss der Adenylylcyclaseinhibition auf die belastungsinduzierte GAG-Synthese und cAMP-Konzentration in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Nach 21-tägiger Vorkultur wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe 30 min vor Belastungsbeginn mit 20 μM MDL-12,330A (MDL) bzw. DMSO vorinkubiert und einer dreistündigen Belastungsepisode unterzogen. **(A)** Die GAG-Synthese unter DMSO oder MDL in unbelasteten Kontrollen (weiße Kreise) und belasteten Proben (schwarze Kreise) wurde über 24 h nach Belastung mittels $^{35}\text{SO}_4$ -Einbaus quantifiziert und auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert. Dargestellt sind die Einzelwerte von 3 Spenderpopulationen. **(B)** cAMP-Konzentration in Kontrollen (schraffiert) und belasteten Proben (schwarz) in mit MDL-12,330A oder DMSO behandelten Proben. Die cAMP-Konzentration wurde in Ganzzelllysaten mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ T-Test Belastung vs. Kontrolle, $n=3$.

Um zu prüfen, ob die belastungsinduzierte Reduktion der GAG-Synthese durch Inhibition der Adenylylcyclase eliminiert werden kann, wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 21 30 min vor Belastungsbeginn, während der Belastung und während des Isotopeneinbaus mit 20 μM MDL bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Alle drei untersuchten Spenderpopulationen der DMSO-Gruppe reagierten auf die Belastung mit einer signifikanten Reduktion der GAG-Synthese, die im Mittel um 23 ± 12 % ($P=0,027$) verringert war (Abbildung 34A). Im Gegensatz dazu führte die Belastung nur noch in einer von drei Spenderpopulationen der MDL-Gruppe zu einer Inhibition der GAG-Synthese, während in zwei Spenderpopulationen kein Abfall der GAG-Synthese mehr ausgelöst wurde. Somit ging die signifikante Regulation der GAG-

Synthese durch Belastung verloren. Um zu prüfen, ob die Inhibition mit 20 μ M MDL einer Aktivierung der Adenylylcyclase durch die Belastung entgegenwirken konnte, wurde die cAMP-Konzentration unter MDL sowie in nicht behandelten Proben nach Belastung und in unbelasteten Kontrollen quantifiziert. Die cAMP-Konzentration wurde aufgrund der niedrigen Fallzahl bei hoher Streuung in dieser Versuchsreihe nicht signifikant durch die Belastung erhöht (Abbildung 34B). Unter Adenylylcyclase-Inhibition mittels MDL zeigte sich eine gleichartige, statistisch signifikante Stimulation der cAMP-Konzentration nach Belastung. Die biologische Aktivität des Inhibitors wurde zuvor geprüft und konnte eine PTHrP(1-34)-induzierte cAMP-Konzentration bis auf etwa 35 pmol/mL absenken (Abbildung 33). Eine Erhöhung der Konzentration von MDL konnte dabei die cAMP-Konzentration nicht weiter reduzieren und auch die basale cAMP-Konzentration wurde nicht maßgeblich durch steigende MDL-Konzentrationen verringert. Dies könnte darauf hinweisen, dass der verwendete cAMP-ELISA nicht sensitiv genug war, um den Effekt von MDL bei geringen cAMP-Konzentrationen, wie sie auch nach Belastung beobachtet wurden, zu detektieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass MDL die ohnehin schon niedrigen cAMP-Konzentrationen bis ca. 40 pmol/mL nicht weiter verringern konnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass AC und MSC-basierte Chondrozyten bei gleichen basalen *PTH LH*-Expressionsspiegeln mit einer Stimulation der *PTH LH*-Expression auf die Belastung reagierten. MSC-basierte Chondrozyten zeigten dabei im Trend höhere *PTH LH*-Spiegel nach Belastung als AC. Passend zur Stimulation der *PTH LH*-Expression löste die Belastung in MSC-basierten Chondrozyten eine erhöhte Konzentration des nachgeschalteten Mediators cAMP aus. Eine Stimulation mit exogenem PTHrP(1-34) stimulierte die cAMP-Konzentration und reduzierte die GAG- und Kollagensynthese um ein ähnliches Ausmaß wie die Belastung. Der PTH-Rezeptor Antagonist PTHrP(7-34) sowie der PKA-Inhibitor H89 waren für die Versuchsreihen nicht geeignet, jedoch erlaubte eine Inhibition der Adenylylcyclase im Trend eine Aufrechterhaltung der GAG-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung an Tag 21.

Insgesamt konnte somit ein Beitrag des cAMP/PKA-Signalwegs an der belastungsinduzierten Reduktion der GAG-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten belegt werden. In weiterführenden Studien sollte jedoch die Fallzahl erhöht werden, um die Aussagekraft eines solchen Ergebnisses zu steigern.

Alles in allem leisteten somit der NF κ B- und der PTHrP-Signalweg einen Beitrag zur Reduktion der EZM-Synthese nach Belastung in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21, während der BMP-Signalweg eine geringe Relevanz für die EZM-Syntheseleistung hatte. Weil eine ähnliche NO-Regulation und deutlich höhere Basalspiegel von PGE₂ in MSC-basierten Chondrozyten nicht mit der basalen EZM-Synthese korrelierten, waren NO und PGE₂ keine

vielversprechenden Kandidaten zur Erklärung der differentiellen Belastungskompetenz von AC versus MSC-basierten Chondrozyten.

4.5 Einfluss mechanischer Belastung auf den Zellphänotyp

Mechanische Belastung kann sowohl einen Einfluss auf die Differenzierung als auch auf den hypertrophen Zellphänotyp haben. Wie in Kapitel 1.5.2.3 dargelegt, wurden in der Literatur pro-chondrogene und anti-chondrogene, sowie pro-hypertrophe und anti-hypertrophe Effekte von Belastung beschrieben. Aufgrund seiner Relevanz in degenerativen Knorpelerkrankungen wie OA sollte untersucht werden, ob bereits eine einmalige dreistündige Belastungsepisode einen Einfluss auf den Zellphänotyp von MSC-basierten Chondrozyten hat. Da im vorangegangenen Abschnitt eine Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs nach Belastung beobachtet wurde und weil aus der Literatur bekannt ist, dass der PTHrP-Signalweg die Differenzierung und den hypertrophen Phänotyp MSC-basierter Chondrozyten regulieren kann, könnten belastungsinduzierte Effekte auf den Zellphänotyp möglicherweise durch den PTHrP-Signalweg bedingt sein. In der Literatur inhibierte eine konstante PTHrP(1-34)-Administration die Differenzierung von MSC *in vitro*, was auch eine Reduktion hypertropher Marker zur Folge hatte (siehe Kapitel 1.5.2.3). Im Gegensatz dazu wirkte eine intermittierende PTHrP(1-34)-Stimulation spezifisch anti-hypertroph. Da die Belastung die chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* reduzierte (siehe Abschnitt 4.4.1), wurde erwartet, dass die einmalige dreistündige Belastungsepisode ähnlich wie eine konstante Gabe von PTHrP(1-34) keinen spezifischen anti-hypertrophen Effekt auf den Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten ausübt, sondern eine Folge der inhibierten Differenzierung ist.

4.5.1 Expression hypertropher und osteogener Marker in AC und MSC-basierten Chondrozyten

Um zunächst zu prüfen, ob MSC-basierte Chondrozyten auch im Kollagen I/III-Träger einen für die *in vitro* Chondrogenese typischen hypertrophen Phänotyp ausbilden, wurde die Expression verschiedener hypertropher und osteogener Marker, sowie des PTH-Rezeptorliganden *PTHrP* in MSC-basierten Chondrozyten mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle für einen nicht-hypertrophen Phänotyp dienten AC, die unter gleichen Bedingungen kultiviert und mittels qRT-PCR analysiert wurden. Sie sollten hypertrophe und osteogene Marker gar nicht oder an der Nachweisgrenze exprimieren.

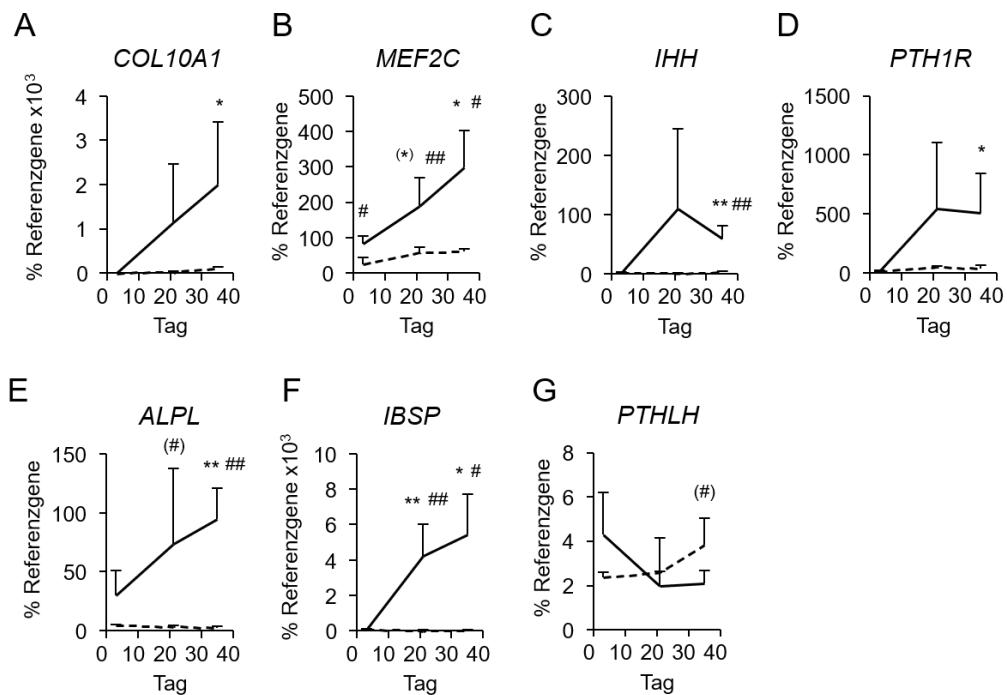


Abbildung 35. Expression hypertropher und osteogener Marker in AC- vs. MSC-basierten Chondrozyten im Zeitverlauf. AC- (gestrichelte Linie) und MSC (durchgezogene Linie) -basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 3, 21 oder 35 Tage kultiviert und anschließend wurde die Genexpression von (A) *COL10A1*, (B) *MEF2C*, (C) *IHH*, (D) *PTH1R*, (E) *ALPL*, (F) *IBSP* und (G) dem PTH-Rezeptorliganden *PTH1H* nach 3, 21 und 35 Tagen in Kultur mittels qRT-PCR analysiert. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$ T-Test vs. Tag 3, # $P < 0,05$, T-Test AC vs. MSC zum gleichen Zeitpunkt, mit Bonferroni-Korrektur ($n = 3-8$).

MSC-basierte Chondrozyten zeigten eine signifikant höhere Expression der hypertrophen Marker *COL10A1* (Abbildung 35A), *MEF2C* (Abbildung 35B), *IHH* (Abbildung 35C) und *PTH1R* (Abbildung 35D), sowie der osteogenen Marker *ALPL* (Abbildung 35E) und *IBSP* (Abbildung 35F) an Tag 35 verglichen mit Tag 3. Die Expression aller oben genannter Marker verblieb im Laufe der Redifferenzierung von AC auf einem niedrigen Niveau. Die Expression des PTH-Rezeptorliganden *PTH1H* (Abbildung 35G) verblieb in beiden Zelltypen im Zeitverlauf auf einem ähnlichen Niveau. Verglichen mit der AC-Gruppe war die Expression von *MEF2C* in MSC-basierten Chondrozyten zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höher. Des Weiteren wurde eine signifikant stärkere Expression von *IBSP* an Tag 21 und 35 (Abbildung 35F), sowie von *ALPL* (Abbildung 35E) und *IHH* (Abbildung 35C) an Tag 35 der Differenzierung in der MSC-Gruppe verglichen mit der AC-Gruppe ermittelt. Außerdem zeigte sich eine höhere Expression von *PTH1H* an Tag 35 in AC versus MSC-basierten Chondrozyten ($P = 0,038$, Signifikanz durch Bonferroni-Korrektur verloren, Abbildung 35G).

Somit konnte gezeigt werden, dass MSC-basierte Chondrozyten unter den verwendeten Differenzierungsbedingungen hypertrophe und osteogene Marker im Zeitverlauf hochregulierten, während AC über die gesamte Kulturdauer niedrige Expressionsspiegel dieser Marker

beibehielten. Aufgrund einer hohen Varianz in den MSC-Spenderpopulationen an Tag 21 wurde nicht für alle untersuchten Marker ein signifikanter Unterschied zu AC erhalten. Die *PTH1R*-Expression war bis auf Tag 35, wo AC höhere Expressionsspiegel aufwies, ähnlich in beiden Gruppen, so dass die basale *PTH1R*-Expression, wie auch in Abschnitt 4.4.5.2 gezeigt, nicht auf Unterschiede im PTHrP-Signalweg zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21 hindeutete. Nichtsdestotrotz wies der typische Anstieg der Expression hypertropher und osteogener Marker darauf hin, dass MSC, wie erwartet, der enchondralen Differenzierung folgten und einen hypertrophen Zellphänotyp ausbildeten, während AC chondral redifferenzierten.

4.5.2 Einfluss der Belastung auf die Expression hypertropher und osteogener Marker in MSC-basierten Chondrozyten

Um zu prüfen, ob die dreistündige Belastungsepisode die Expression der hypertrophen und osteogenen Marker beeinflussen kann, wurden belastete Proben und nicht-belastete Kontrollen von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nach 21 oder 35 Tagen Vorkultur mittels qRT-PCR analysiert. Dazu wurde zunächst die relative Genexpression hypertropher und osteogener Marker nach Belastung ermittelt (Abbildung 36). Um bewerten zu können, ob belastungsinduzierte Effekte auf die untersuchten hypertrophen und osteogenen Gene lediglich eine Folge der inhibierten Differenzierung sind, wurde anschließend eine Normalisierung auf die *COL2A1*-Expression vorgenommen (Abbildung 37).

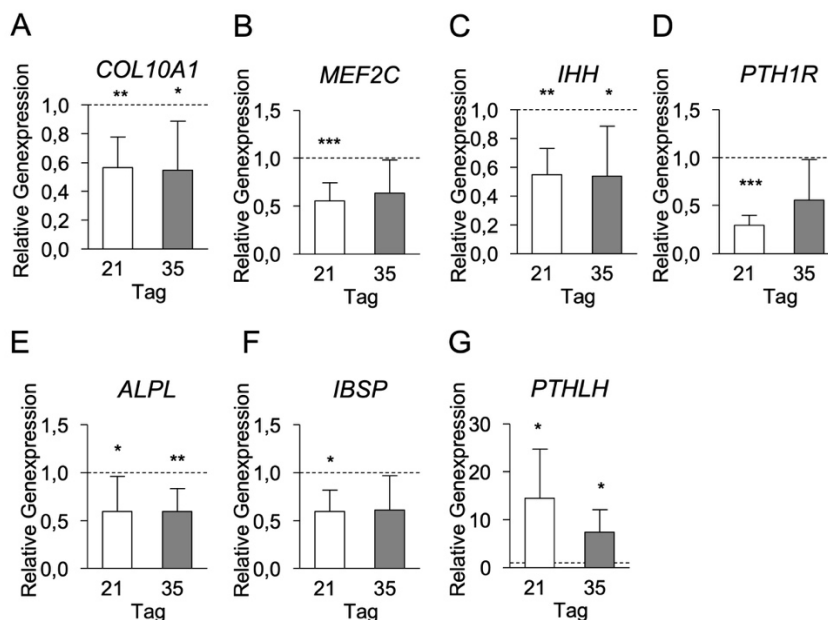


Abbildung 36. Regulation hypertropher und osteogener Marker in MSC-basierten Chondrozyten durch Belastung. MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe wurde für 21 oder 35 Tage vorkultiviert und anschließend mit einer dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Genexpression belasteter Proben und nicht-belasteter Kontrollen für (A) *COL10A1*, (B) *MEF2C*, (C) *IHH*, (D) *PTH1R*, (E) *ALPL*, (F) *IBSP* und (G) des PTH-Rezeptorliganden *PTH1R* wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die

nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$ T-Test belastete Proben vs. nicht belastete Kontrollen (n=6-8).

Die Expression von *COL10A1* wurde durch die Belastung an Tag 21 signifikant um 44 ± 20 % ($P=0,008$) und an Tag 35 um 46 ± 31 % reduziert (Abbildung 36A). *MEF2C* wies an Tag 21 eine signifikante Reduktion um 46 ± 18 % ($P=0,008$) auf, während der Unterschied an Tag 35 keine Signifikanz erreichte (Abbildung 36B). Die Expression des hypertrophen Markers *IHH* wurde durch die Belastung an Tag 21 und 35 signifikant inhibiert (Tag 21 um 45 ± 17 %, $P=0,008$; Tag 35: um 46 ± 32 %, $P=0,048$, Abbildung 36C). *PTH1R* wurde durch die Belastung an Tag 21 signifikant inhibiert (um 71 ± 10 %, $P=0,000014$), nicht aber an Tag 35 (Abbildung 36D). Die Genexpression von *ALPL* wurde durch die Belastung an Tag 21 und Tag 35 der Differenzierung signifikant reduziert (Tag 21 um 41 ± 34 %, $P=0,017$; Tag 35: um 40 ± 22 %, $P=0,009$, Abbildung 36E). Der osteogene Marker *IBSP* wurde durch die Belastung an Tag 21 signifikant um 31 ± 25 % ($P=0,029$) reduziert und zeigte eine Tendenz zur Reduktion an Tag 35 um 38 ± 32 % ($P=0,224$), die aufgrund eines Ausreißers nicht signifikant wurde (Abbildung 36F). Die Belastung stimulierte die Expression des PTH-Rezeptorliganden *PTH1LH* signifikant an Tag 21 und 35 (Abbildung 36G).

Insgesamt konnte die dreistündige Belastungsepisode die Genexpression hypertropher und osteogener Marker in MSC-basierten Chondrozyten reduzieren, während die *PTH1LH*-Expression stimuliert war. Ob die Regulation dieser Gene durch die Belastung nur durch eine reduzierte Differenzierung bedingt war, von der auch diese Differenzierungsmarker betroffen sind, oder einen spezifisch anti-hypertrophen Effekt der Belastung darstellte, wurde im nächsten Schritt anhand einer Normalisierung der Expressionsspiegel auf *COL2A1* untersucht.

4.5.3 Normalisierung der Expression hypertropher und osteogener Marker auf *COL2A1*

Wurde die belastungsinduzierte Expression von *COL10A1*, *MEF2C*, *IHH*, *PTH1R*, *ALPL*, *IBSP*, sowie *PTH1LH* auf die Expression von *COL2A1* normalisiert (Abbildung 37), ergab sich einzig für *PTH1R* (Abbildung 37D) eine signifikante belastungsinduzierte Reduktion an Tag 21, sowie eine signifikante Stimulation seines Liganden *PTH1LH* an Tag 21 und 35 (Abbildung 37G).

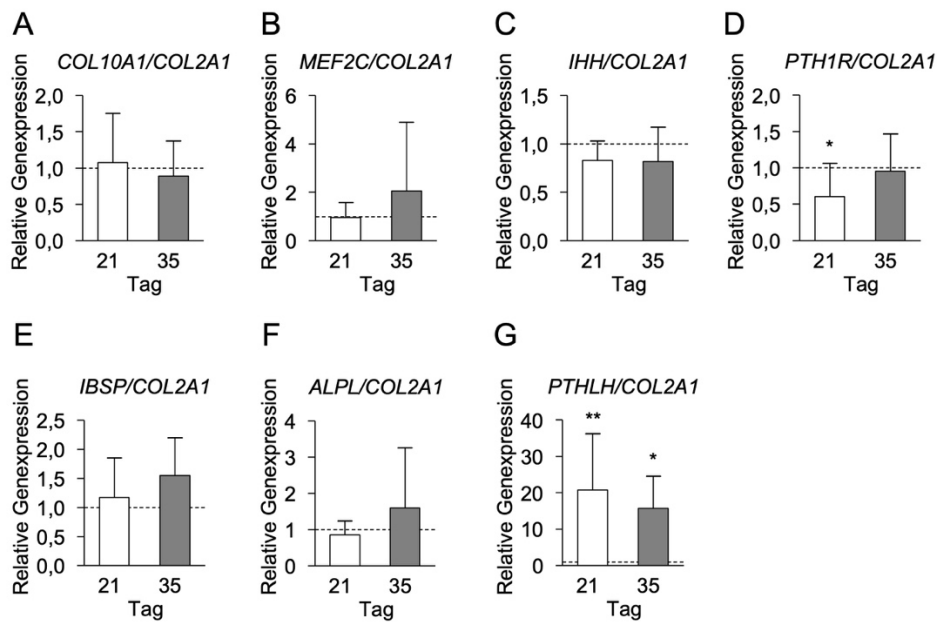


Abbildung 37. Expression hypertropher und osteogener Marker nach Belastung nach Normalisierung auf COL2A1 in MSC-basierten Chondrozyten. Nach 21 oder 35 Tagen Vorkultur wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe mit einer dreistündigen zyklischen Kompressionsepisode belastet. Die Genexpression belasteter Proben und nicht-belasteter Kontrollen für **(A) COL10A1**, **(B) MEF2C**, **(C) IHH**, **(D) PTH1R**, **(E) ALPL**, **(F) IBSP** und **(G) PTHLH** wurde mittels qRT-PCR analysiert und auf die Expressionsspiegel von COL2A1 normalisiert. Die nicht-belasteten Kontrollen jeder Spenderpopulation wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie) und die zugehörige belastete Probe darauf bezogen. Als Referenzgene wurden *CPSF6* und *HNRPH1* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung. * $P < 0,05$ T-Test belastete Proben vs. nicht belastete Kontrollen ($n=6-8$).

Folglich ging die in Abbildung 36 gezeigte Reduktion von *COL10A1*, *MEF2C*, *ALPL* und *IBSP* nicht über die parallele Reduktion von *COL2A1* hinaus, so dass ihr Absenken als Folge der reduzierten Differenzierung interpretiert werden muss und nicht als spezifische Veränderung des Zellphänotyps. *PTHLH* wurde jedoch unabhängig von *COL2A1* durch die Belastung stimuliert, was eine mögliche Rolle von PTHrP in der Regulation von Zellphänotypmarkern durch die Belastung andeuten könnte.

4.5.5 Einfluss einer PTHrP-Stimulation auf die Expression hypertropher und osteogener Marker

Sollte eine belastungsinduzierte PTHrP-Stimulation kausal mit der Regulation von Zellphänotypmarkern verbunden sein, sollte auch eine Aktivierung des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs anstelle von Belastung die Expression hypertropher und osteogener Marker entsprechend regulieren. Um dies zu prüfen, wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 21 für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 1 mM dbcAMP stimuliert, während parallele Proben belastet wurden. Nachfolgend wurde die Genexpression mittels qRT-PCR vergleichend mit der unbehandelten, unbelasteten Kontrollgruppe analysiert.

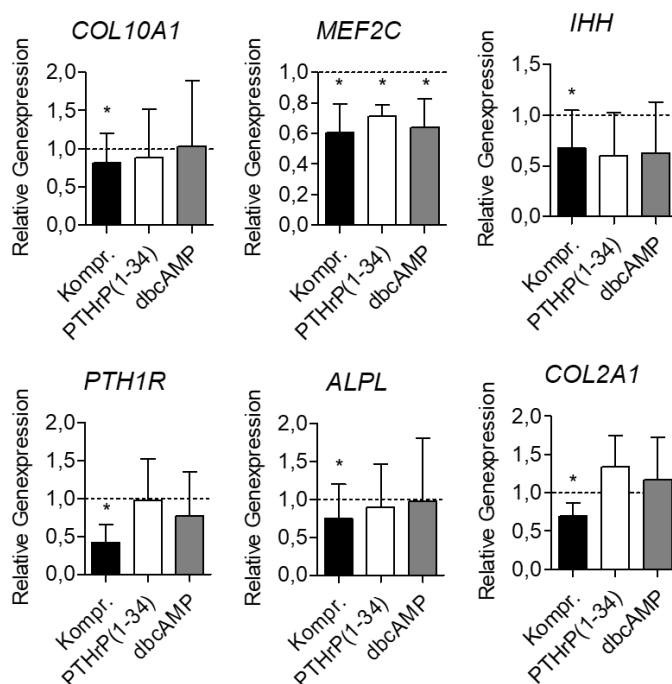


Abbildung 38. Regulation der Expression hypertropher und osteogener Marker sowie von COL2A1 durch PTHrP(1-34) oder dbcAMP in MSC-basierten Chondrozyten. Nach 21 Tagen Vorkultur wurde MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe dem dreistündigen Belastungsprotokoll unterzogen oder für 3 h mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) oder 1 mM dbcAMP behandelt. Die Genexpression hypertropher und osteogener Marker wurde in nicht-belasteten Kontrollen (Ktrl), belasteten Proben (Kompr.) sowie in mit PTHrP(1-34) oder dbcAMP stimulierten Proben mittels qRT-PCR analysiert und auf die nicht-belastete, nicht-behandelte Kontrolle normalisiert. Als Referenzgene dienten *CPSF6* und *HNRPH1*. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung, N=4-9. *P<0,05 MWU belastete bzw. behandelte Proben vs. Nicht-belastete, nicht-behandelte Kontrollen.

Eine Stimulation mit 10 ng/mL PTHrP(1-34) bzw. 1 mM dbcAMP für 3 h führte, anders als die Belastung, nicht zu einer signifikanten Reduktion der hypertrophen Marker *COL10A1* und *PTH1R* und der osteogenen Marker *IBSP* und *ALPL* (Abbildung 38). Eine Behandlung mit PTHrP(1-34) führte zu einer Reduktion der *IHH*-Expression im Trend, die aufgrund einer geringen Fallzahl nicht statistisch signifikant war. Interessanterweise reduzierten alle drei Behandlungsgruppen die Expression von *MEF2C*, was darauf hindeutet, dass die belastungsabhängig reduzierte Expression von *MEF2C* durch eine belastungsinduzierte Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg bedingt sein könnte. *COL2A1* war weder durch PTHrP(1-34), noch durch dbcAMP signifikant reguliert.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des PTHrP/cAMP-Signalwegs allein nur die Expression des hypertrophen Markers *MEF2C* inhibiert, so dass der PTHrP-Signalweg nicht nur die Expression der mechanosensitiven Gene *FOS* und *BMP6* (Abbildung 30) stimuliert, sondern auch die Expression des wichtigen pro-hypertrophen Transkriptionsfaktors *MEF2C* inhibiert.

Demzufolge hatte der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg zwar nur einen selektiven Einfluss auf *MEF2C*-Expressionsspiegel, ein kausaler Zusammenhang zwischen belastungsinduzierter

PTHrP-Stimulation und einer möglichen Regulation des Zellphänotyps bedarf jedoch weiterer Analyse.

Zusammenfassend zeigten MSC-basierte Chondrozyten mit steigender Vorkulturdauer einen hypertrophen Zellphänotyp. Die dreistündige Belastung resultierte einhergehend mit einer Inhibition der Differenzierung in einer Reduktion bekannter hypertropher und osteogener Marker, so dass keine spezifische anti-hypertrophe, sondern eine anti-chondrogene Wirkung der Belastung auftrat. Zwar wurde *PTH LH* spezifisch durch die Belastung stimuliert, allerdings wies eine Stimulation des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs durch PTHrP(1-34) und dbcAMP darauf hin, dass die Inhibition der Differenzierung durch die Belastung nicht allein als Folge einer PTHrP-Stimulation auftreten kann und andere Signalwege in die anti-chondrogenen Effekte der Belastung involviert sein müssen.

5 Diskussion

Bedingt durch den demographischen Wandel wird die Bevölkerung immer älter. Eine älter werdende Gesellschaft geht allerdings mit einer steigenden Inzidenz degenerativer Erkrankungen wie Arthrose einher (Vina und Kwok 2018). Da der betroffene Gelenknorpel eine geringe intrinsische Regenerationskapazität hat, wurden verschiedene Therapieoptionen zur Knorpelreparatur etabliert. Mittels Tissue Engineering kann Knorpelersatzgewebe *in vitro* aus AC und MSC, die zu Chondrozyten heranreifen können, hergestellt werden. Um eine Knorpelfunktion wie bei nativem Gewebe zu ermöglichen, ist es von entscheidender Bedeutung, dass das Knorpelersatzgewebe eine adäquate Mechanokompetenz aufweist. Das bedeutet, dass die Aspekte der Mechanokopplung, Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung gewährleistet sein müssen. Zwar wurden bereits Fortschritte in der Entschlüsselung der Mechanismen dieser Aspekte für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe gemacht, für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe ist bislang jedoch wenig bekannt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe die gleiche Mechanokompetenz entwickelt wie AC-basiertes Knorpelersatzgewebe. Dazu wurde AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineering gezüchtet und, bei standardisierter Mechanokopplung, die Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung beider Gewebe in Reaktion auf eine dreistündige Belastungsepisode vergleichend analysiert. Die Mechanokopplung konnte anhand des GAG-Gehalts und der Härte des Ersatzgewebes standardisiert werden. AC und MSC-basierte Chondrozyten reagierten auf eine einmalige zyklische Kompressionsepisode, die die Belastung von dreistündigem Gehen in 10 min Intervallen im Kniegelenk simulierte, mit einer gleichartigen Stimulation verschiedener Mechanotransduktionsparameter. Allerdings zeigten AC und MSC-basierte Chondrozyten eine unterschiedliche Mechanoadaptierung basierend auf einer belastungsinduzierten Reduktion der GAG- und Kollagensynthese in MSC-basierte Chondrozyten und einer variablen SOX9-Regulation, während die EZM-Synthese in AC an Tag 21 aufrechterhalten und an Tag 35 gesteigert wurde und SOX9 konsistenter stimuliert wurde. Der anabole BMP-Signalweg hatte keine entscheidende Rolle in dieser differenziellen Regulation, während katabole Einflüsse des NFκB-Signalwegs einen Beitrag zur inhibierten EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung leisteten. Durch Inhibition von NFκB zeigten sich erhöhte SOX9-Spiegel, jedoch konnte keine konsistente Stimulation durch die Belastung installiert werden. NO und PGE₂ wurden durch die Belastung in beiden Knorpelersatzgeweben stimuliert, jedoch wurde ein maßgeblicher Beitrag an der differenziellen EZM-Synthese als unwahrscheinlich bewertet und daher nicht weiter untersucht. Die Belastung stimulierte die *PTH1LH*-Expression in beiden Zelltypen und der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg deutete einen Beitrag zur belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten an. Der hypertrophe Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten

wurde durch die Belastung reduziert, jedoch als Folge anti-chondrogener Effekte, die nicht allein durch den PTHrP-Signalweg bedingt waren.

5.1 Beurteilung der Qualität des hergestellten Knorpelersatzgewebes

5.1.1 Einfluss der Knochenersatzphase auf die GAG-Ablagerung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Da natives, humanes Knorpelgewebe aufgrund seiner geringen intrinsischen Regenerationskapazität praktisch nicht verfügbar ist, wurden für die vorliegende Arbeit mithilfe des Tissue Engineerings Knorpelersatzgewebe *in vitro*, bestehend aus einer zellbesiedelten Kollagen Typ I/III-Trägerphase mit humanen AC oder MSC, hergestellt und zur Bildung einer osteochondralen Einheit mit einer unbesiedelten Knochenersatzphase aus β -TCP kombiniert.

Das hier verwendete AC-basierte Knorpelersatzgewebe wurde bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe etabliert und in Kompressionsstudien charakterisiert (Hecht et al. 2019; Praxenthaler et al. 2018; Scholtes et al. 2018). Da hohe extrazelluläre Kalziumkonzentrationen im Zellkulturmedium bzw. hohe lokale Kalziumkonzentrationen in Kalzium-haltigen Knochenersatzmaterialien in verschiedenen Studien mit MSC zu einer reduzierten GAG- und Kollagen Typ II-Ablagerung führten (Mellor et al. 2015; Sarem et al. 2018), wurde in dieser Studie zunächst geprüft, ob β -TCP als Knochenersatzmaterial einen Einfluss auf die GAG-Ablagerung von MSC-basierten Chondrozyten hat. Ein direkter Vergleich mit einem inerten Borosilikatglas-träger als Knochenersatzmaterial zeigte jedoch, dass die β -TCP-Knochenersatzphase die GAG-Ablagerung von MSC-basierten Chondrozyten in der Knorpelersatzphase sogar förderte. Die qualitative histologische Auswertung deutete allerdings an, dass Defizite in der GAG-Ablagerung in Knorpelersatzgewebe mit Borosilikat als Knochenersatzmaterial besonders in der unmittelbaren Umgebung der Knochenersatzphase auftraten. Hierfür kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Frage. Einmal könnte dies durch die deutlich unterschiedliche Porosität der Träger (β -TCP 70 %, Borosilikatglas 36 %) bedingt sein, was zu starken Unterschieden in der Mediumsversorgung von der Knochenersatzphase her führen könnte. Ein weiterer Grund für die unterschiedliche GAG-Ablagerung könnte die Topografie der Knochenersatzphase darstellen, da mesenchymale Zellen schon auf kleine Unterschiede der Steifigkeit (Olivares-Navarrete et al. 2017), Oberflächenbeschaffenheit, -chemie und Kristallinität der Träger reagieren. Diese Oberflächenparameter beeinflussen die Adhäsion der Zellen und können die Linienentscheidung mesenchymaler Zellen und den Zellmetabolismus sowie die Synthese von GAG und Kollagenen regulieren (Boyan et al. 1996). Die Oberflächenparameter der beiden Träger wurden in dieser Arbeit nicht verglichen, jedoch könnten die beiden Träger bedingt durch ihre unterschiedliche Porosität auch unterschiedliche Oberflächenparameter aufweisen.

Möglicherweise könnte auch die Anwesenheit von Kalzium im β -TCP-Block eine Rolle in der erhöhten GAG-Ablagerung gespielt haben. Ob die Kalziumkonzentration im Medium oder im Knorpelersatzgewebe durch die Verwendung von β -TCP als Knochenersatzmaterial erhöht war, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geprüft. Die Daten belegten, dass die bereits in Vorarbeiten etablierte Kombination aus Kollagen I/III-Träger für die Herstellung der Knorpelersatzphase und β -TCP als Knochenersatzphase auch für die Züchtung von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe geeignet war und nach 21 und 35 Tagen Vorkultur eine homogene GAG-Ablagerung vorlag. Dies ermöglichte eine vergleichende Analyse der Ablagerung von Matrixmolekülen in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nach unterschiedlichen Vorkulturdauern.

5.1.2 Evaluierung der Qualität von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

Unter den gleichen chondrogenen Bedingungen sollten AC und MSC (re)differenzieren und EZM-Moleküle in den Träger ablagern. Dies wurde anhand von histologischen und quantitativen Analysen nach 3, 21 und 35 Tagen untersucht. Der Kollagen Typ I/III-Träger ermöglichte den Zellen eine charakteristische runde Morphologie und imitierte aufgrund der parallelen Anordnung der Kollagenfasern die Struktur von nativem Knorpel. Die Knochenersatzphase aus β -TCP, die den subchondralen Knochen imitieren sollte, ermöglichte ein Einwachsen der Zellen, so dass eine gute Integration der Knorpel- mit der Knochenphase erlangt werden konnte. Dies ist klinisch für die Behandlung von osteochondralen Defekten interessant, da so die Gefahr eines mechanischen Versagens des Implantats verringert werden könnte (Boushell et al. 2017).

Wie in den Vorarbeiten (Praxenthaler et al. 2018) wurde auch in dieser Arbeit AC-basiertes Knorpelersatzgewebe mit einem hohen GAG-Gehalt und einer Härte, die hier 89 % nativer Knorpelstanzen erreichte, hergestellt. Die gewählte Kombination des Kollagen I/III-Trägermaterials mit dem Knochenersatzmaterial β -TCP ermöglichte auch den MSC unter den gleichen chondrogenen Kulturbedingungen eine qualitativ vergleichbare GAG- und Kollagen Typ II-Ablagerung an Tag 21 und Tag 35 wie AC, sowie quantitativ einen ähnlichen GAG/DNA-Gehalt und die gleiche Härte, die sich der Härte von nativem Knorpel im Laufe der Differenzierung annäherte. Interessanterweise zeigten AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe einen unterschiedlichen Verlauf des DNA-Gehalts über die Kulturdauer. So starteten AC mit einem geringeren DNA-Gehalt an Tag 3 der Kultur als MSC, obwohl sie in der gleichen Zellzahl wie MSC in den Kollagen I/III-Träger gesiedelt wurden. Im Lauf der Kulturdauer nahm der DNA-Gehalt in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe stetig zu und erreichte an Tag 21 die gleichen Werte wie MSC, während der DNA-Gehalt in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe über die Kulturdauer konstant blieb. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Überführung von MSC von der Expansion in eine Hochdichte-Pelletkultur ohne Träger unter

chondrogenen Bedingungen zu einem signifikanten DNA-Einbruch führte, der im Laufe der Kultur auf diesem niedrigen Niveau verblieb (Buchert et al. 2019; Dexheimer et al. 2012; Fischer et al. 2018). Bemerkenswerterweise wurde dieser typische Zellverlust nicht bei der hier verwendeten Kultur der MSC im Kollagen I/III-Träger beobachtet, so dass die Wahl des Kollagen I/III-Trägers günstig für den Zellerhalt zu sein schien. Der an Tag 3 signifikant niedrigere DNA-Gehalt in AC- vs. MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe wies darauf hin, dass AC mit einem initialen Zellverlust auf die chondrogenen Bedingungen reagierten oder dass weniger Zellen an den Träger adhärten. Möglicherweise reagierten AC empfindlicher auf die Besiedlung als MSC und der Stress der chondrogenen Induktion könnte zu einem Verlust einer Teilpopulation der AC geführt haben.

In der Studie von Fischer et al. in Pelletkultur wurde gezeigt, dass die Proliferation der Zellen zunächst von Tag 0 bis Tag 3 sank und anschließend im Lauf der Chondrogenese wieder anstieg. Die Diskrepanz zwischen niedrigem DNA-Gehalt bei steigender Proliferation wies auf eine Balance zwischen Proliferation und Zelltod hin (Fischer et al. 2018). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete konstante DNA-Gehalt in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe könnte also auf eine günstigere Balance zwischen Zelltod und Proliferation hinweisen. Der steigende DNA-Gehalt in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe im Lauf der Kultur kann nur durch Proliferation erklärt werden. Für die hier gestellte Aufgabe war die Aufklärung der Ursachen für den konstanten DNA-Gehalt in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe und den steigenden DNA-Gehalt in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe jedoch nicht relevant.

Alles in allem konnte Knorpelersatzgewebe aus MSC etabliert werden, welches unter den gleichen Kulturbedingungen den gleichen GAG-Gehalt und eine ähnliche, knorpeltypische Härte wie AC-basiertes Knorpelersatzgewebe aufbaute.

5.2 Wahl der Belastungsbedingungen

Der EZM-Gehalt und die mit ihm verbundene Härte sind entscheidende Faktoren für die Mechanokompetenz von Knorpelgewebe und bestimmen maßgeblich die Mechanokopplung (Grodzinsky et al. 2000). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die belastungsinduzierte GAG-Synthese von AC im Knorpelersatzgewebe von der GAG-Ablagerung abhing, so dass an Tag 21 ein Erhalt der GAG-Synthese und an Tag 35 eine Steigerung der GAG-Synthese beobachtet werden konnte. Somit beeinflusste das Ausmaß der Mechanokopplung auch die Mechanoadaptierung der Chondrozyten. Dabei wurde ein Schwellenwert von 600 µg GAG pro Probe ermittelt, ab dem eine Steigerung der GAG-Synthese beobachtet werden konnte (Praxenthaler et al. 2018). Basierend auf dem Erhalt bzw. der Steigerung der GAG-Synthese wurde die verwendete dreistündige zyklische Belastungsepisode als physiologisches Belastungsprotokoll für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe bewertet.

Eine homogene, reichliche EZM-Ablagerung wurde bislang nur in wenigen Kompressionsstudien mit humanen AC und MSC abgewartet, bevor Belastung appliziert wurde (Bian et al. 2012; McDermott et al. 2021). Dies liegt zum einen daran, dass Trägermaterialien wie Alginate die Ablagerung von EZM-Molekülen auf die perizelluläre Matrix begrenzen können (Schiavi et al. 2018). Zum anderen verfolgten einige Studien das Ziel, eine exogene Administration von TGF- β während der Kulturführung durch mechanische Belastung zu verringern oder zu ersetzen, so dass häufig eine geringe oder heterogene EZM-Ablagerung akzeptiert wurde (Cochis et al. 2017; Monaco et al. 2021; Pelaez et al. 2012; Schatti et al. 2011; Schiavi et al. 2018). TGF- β ist für die chondrogene Differenzierung von MSC jedoch essenziell. Vor allem liegt TGF- β in nativem Knorpel in der EZM-gebunden vor und wird durch mechanische Belastung freigesetzt und aktiviert (Albro et al. 2012). Außerdem befindet sich TGF- β in der Synovialflüssigkeit, aus der es ebenfalls durch Scherbelastung freigesetzt und aktiviert werden kann und so den Chondrozyten zur Verfügung steht (Fava et al. 1989). Somit entspricht eine Kultur, in der mechanische Belastung TGF- β ersetzen soll, nicht den physiologischen Bedingungen von nativem Knorpel. Andere Studien verfolgten das Ziel, durch wiederholte Belastungsepisoden während der Kultur unter chondrogenen Bedingungen die Differenzierung zu fördern und die physikalische Mikroumgebung von nativem Knorpel zu imitieren (Bian et al. 2012; McDermott et al. 2021; Sawatjui et al. 2018). Es wurde berichtet, dass wiederholte mechanische Belastung die GAG-Ablagerung steigern könnte, jedoch wurde in einigen Studien vorwiegend eine erhöhte GAG-Konzentration im konditionierten Medium beobachtet, so dass von den Zellen produzierte GAGs nicht ausreichend im Träger zurückgehalten werden konnten und durch die Belastung ausgespült wurden (Cochis et al. 2017; Li et al. 2009; Schatti et al. 2011). Auch für das von uns etablierte Knorpelersatzgewebe basierend auf AC wurde durch wiederholte tägliche Belastungsepisoden von Tag 21 bis Tag 35 ein Verlust von GAG ausgelöst (Scholtes et al. 2018). Eine einmalige Anwendung des physiologischen Belastungsprotokolls hatte jedoch keinen messbaren Einfluss auf den GAG-Gehalt und die Härte, was in der vorliegenden Arbeit für AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe bestätigt werden konnte. Das in der vorliegenden Arbeit hergestellte Knorpelersatzgewebe zeigte eine Steigerung des GAG-Gehalts rein durch die Kultur unter chondrogenen Bedingungen, so dass der Versuch, eine Steigerung der GAG-Produktion durch wiederholte Belastungsepisoden zu ermöglichen, als nicht notwendig angesehen wurde. Außerdem schien die Gefahr eines Verlusts von EZM-Molekülen durch wiederholte Belastung aufgrund der Vorarbeiten von Scholtes et al. als zu riskant (Scholtes et al. 2018). Da diese Arbeit zudem nicht das Ziel verfolgte, eine Verbesserung der Differenzierung von MSC durch mechanische Belastung zu erreichen, sondern die Mechanokompetenz von MSC- mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu vergleichen und bei gleicher Mechanokopplung die zugrundeliegenden molekulare Mechanismen der Mechanotransduktion und Mechanoadaptation zu entschlüsseln, wurde also keine Langzeitbelastung, sondern eine

einmalige Belastungsepisode gewählt, die zuvor für das verwendete AC-basierte Knorpelersatzgewebe als physiologisch identifiziert wurde.

Der gleiche GAG/DNA-Gehalt und die gleiche Härte in Knorpelersatzgewebe beider Zelltypen ermöglichte so auch eine möglichst vergleichbare Mechanokopplung, die eine vergleichende Untersuchung der Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung erlaubte. Die hier vorliegenden Daten zeigen damit, dass das hergestellte Knorpelersatzgewebe sowohl für AC als auch für MSC ein relevantes Knorpelmodell darstellt, das versucht, die Situation im Gelenk möglichst gut abzubilden.

5.3 Evaluierung von Mechanokopplungsparametern in Knorpelersatzgewebe

Wie in Abschnitt 5.2 erläutert, wiesen AC und MSC-basierte Knorpelersatzgewebe einen ähnlichen GAG-Gehalt und die gleiche Härte auf, die unter der dreistündigen Belastungsepisode konstant gehalten wurden und somit eine einheitliche Mechanokopplung über den Belastungszeitraum gewährleisten. Somit lag zwar kein Unterschied im GAG-Gehalt zwischen AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe vor, jedoch könnte möglicherweise eine unterschiedliche Matrixkomposition vorliegen, die einen Einfluss auf die Mechanokopplung bis hin zur Mechanoadaptierung haben könnte. Zwar waren die charakteristischen chondrogenen Marker *ACAN* und *COL2A1*, die auf Proteinebene im hyalinen Knorpel auch die höchsten Anteile der EZM-Moleküle ausmachen (Eyre 1991; Sophia Fox et al. 2009), an Tag 21 auf Genexpressionsebene nicht unterschiedlich zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten exprimiert und *COL2A1* an Tag 35 sogar signifikant höher in MSC-basierten Chondrozyten als in AC, jedoch zeigte sich eine signifikant höhere Expression des Matrixproteins *COMP* in AC über die gesamte Kulturdauer bis Tag 35. *COMP* wurde eine Rolle in der Kollagensekretion zugesprochen (Schulz et al. 2016) und kann mit Kollagen Typ II (Briggs und Chapman 2002; Budde et al. 2005) und Aggrekan (Chen et al. 2007) interagieren. In Studien mit Pferdesehnen wurde gezeigt, dass der *COMP*-Gehalt mit der Widerstandskraft gegenüber Zugbelastung und der Steifigkeit der Sehnen in jungen Pferden (2 Jahre + 2 Monate) korrelierte. Dies deutet an, dass *COMP* an der Widerstandskraft gegenüber mechanischer Belastung beteiligt sein könnte (Smith et al. 2002). Durch Bindung an Kollagenfibrillen könnte *COMP* zu einer strukturellen Verstärkung der EZM führen (Sodersten et al. 2005). Ein Vergleich von gesundem vs. OA-Knorpel, der eine reduzierte Widerstandskraft gegenüber gesundem Knorpel hatte, zeigte eine homogene Verteilung von *COMP* im gesunden Knorpel, während *COMP* auf die Oberflächzone im OA-Knorpel begrenzt war (Acharya et al. 2014). Dies unterstützt die These, dass *COMP* an der Matrixintegrität und Widerstandskraft des Knorpels gegenüber mechanischer Belastung beteiligt sein könnte. Außerdem wurde in Bindungs- und Reporterassays *in vitro* gezeigt, dass *COMP* Liganden der TGF- β -Superfamilie wie BMP2 und TGF- β 1 binden und deren Bioaktivität erhöhen kann (Haudenschild et al. 2011; Ishida et al. 2013). Die höhere

Expression von *COMP* in AC vs. MSC-basierten Chondrozyten könnte somit auch mit einer höheren Resistenz des Gewebes gegenüber mechanischem Stress einhergehen und eine höhere Bioaktivität von TGF- β in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe ermöglichen, was die EZM-Synthese unter Belastung beeinflussen könnte. Um dies zu bestätigen, gilt es in künftigen Studien, die *COMP*-Proteinspiegel in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu vergleichen und in dieser Arbeit gewisse Unterschiede in der Mechanokopplung zwischen beiden Knorpelersatzgeweben nicht aus den Augen zu verlieren.

5.4 Evaluierung von Mechanotransduktionsparametern in Knorpelersatzgewebe

Um die Mechanotransduktion in AC- und MSC-basierten Chondrozyten nach Anwendung des dreistündigen Belastungsprotokolls zu vergleichen, wurden wichtige quantitative Mechanotransduktionsparameter herangezogen. Für AC- und MSC-basierte Chondrozyten ergab sich dabei kein Unterschied in der Aktivierung von pERK1/2 und auch die Expression mechano-sensitiver Gene und miRs war ähnlich stark in beiden Zelltypen stimuliert. Die wenigen Unterschiede, die zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten beobachtet wurden, umfassten die Integrinexpression und die Regulation von SOX9.

In der Literatur wurde bereits eine belastungsinduzierte pERK1/2-Aktivierung in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe mit Zellen unterschiedlicher Spezies berichtet (Bougault et al. 2012; Fitzgerald et al. 2008; Hecht et al. 2019; Scholtes et al. 2018; Xie et al. 2021), so dass die hier beobachtete pERK1/2-Aktivierung durch die dreistündige Belastungsepisode für AC im Einklang mit der Literatur steht. Die in dieser Arbeit für MSC-basierte Chondrozyten beobachtete pERK1/2-Aktivierung steht jedoch im Widerspruch zu einer Studie von Zhang et al., die eine Reduktion von pERK1/2 durch mechanische Belastung berichteten (Zhang et al. 2015). Aufgrund der unterschiedlichen Kulturbedingungen und Belastungsprotokolle ist deren Studie jedoch nicht direkt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Da AC und MSC-basierte Chondrozyten gleichermaßen mit einer ERK1/2-Stimulation auf die Belastung reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass eine vergleichbare Mechanotransduktion in den MAPK-Signalweg in beiden Gruppen erfolgte.

Integrine, die als Mechanorezeptoren physikalische Reize wahrnehmen, wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der Genexpressionsspiegel vergleichend in AC und MSC-basierten Chondrozyten untersucht. Dabei wurde eine höhere basale *ITGA11*-Expression in AC vs. MSC-basierten Chondrozyten und eine Reduktion der *ITGA10*-Expression nach Belastung ausschließlich in MSC-basierten Chondrozyten beobachtet. Integrin $\alpha 10$ stellt in adulten Chondrozyten das wichtigste Kollagen Typ II-bindende Integrin dar (Camper et al. 1998) und auch Integrin $\alpha 11$ bindet Kollagene (Loeser 2014). Eine geringere Expression der $\alpha 11$ -Integrinkette und eine belastungsinduzierte Reduktion der $\alpha 10$ -Integrinkette in MSC-basierten

Chondrozyten könnte auf eine reduzierte Wahrnehmung mechanischer Reize hindeuten. Weil Integrin-Kollagen-Verbindungen mit einem erhöhten Widerstand der Knorpelmatrix gegen Zugkräfte assoziiert sind (Roca-Cusachs et al. 2012), die hier nicht weiter analysiert wurden, könnten reduzierte Spiegel kollagenbindender Integrine auf einen Schutzmechanismus hinweisen, der die Zellen vor hyperphysiologischen mechanischen Kräften schützt. Jedoch zeigte sich sowohl in AC als auch in MSC-basierten Chondrozyten eine pERK1/2-Aktivierung nach Belastung, die einer Integrin $\alpha 10$ -Aktivierung nachgeschaltet ist (Loeser 2014). Demzufolge spiegeln sich die Unterschiede in der *ITGA10*- und *-11*-Expression nicht in der Aktivierung eines wichtigen nachgeordneten Mediators der Integrin-vermittelten Signalübertragung wider. Eine Analyse der Integrinexpression auf der Proteinebene sowie weiterer nachgeordneter Mediatoren der Integrin-vermittelten Signalübertragung, wie der FAK oder der PKC, könnte weitere Schlüsse über mögliche Unterschiede in der Integrin-vermittelten Signalübertragung zulassen.

In Vorarbeiten wurde bereits für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe an Tag 35 eine Mechanoinduktion der gängigen mechanosensitiven Gene *FOS* und *FOSB* sowie der weiteren mechanosensitiven Gene *DUSP5*, *AXUD1*, *NR4A2*, *COX2/PTGS2*, *BMP2*, *BMP6* und *SOX9* beschrieben (Scholtes et al. 2018). Somit steht die hier für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe nach 21 und 35 Tagen Vorkultur beobachtete Stimulation dieser Gene durch die Belastungsepisode im Einklang mit unseren Vorarbeiten und mit den Berichten anderer (Bougault et al. 2012; Diao et al. 2017; Li et al. 2013). Bis auf *SOX9* reagierten MSC-basierte Chondrozyten mit einer ähnlichen Belastungsinduktion dieser mechanosensitiven Gene. Erstmals wurde in dieser Arbeit eine Mechanoinduktion von *FOS*, *FOSB*, *DUSP5*, *AXUD1*, *NR4A2*, *COX2/PTGS2*, *BMP2* und *BMP6* in humanem MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe berichtet. *SOX9* reagierte jedoch variabel und widerspricht somit Studien mit humanen MSC (Cochis et al. 2017) und Kaninchen MSC (Huang et al. 2005), die eine belastungsinduzierte Stimulation von *SOX9* zeigten. Da *SOX9* als ein Masterregulator der chondrogenen Differenzierung angesehen wird, wies eine variable *SOX9*-Induktion auf Defizite in der EZM-Synthese hin, die als Hauptparameter der Mechanoadaptierung in Abschnitt 5.5 diskutiert wird.

Die mechanosensitiven microRNAs miR-221, miR-6723-5p und miR-6872-3p wurden durch die Belastung gleichermaßen in AC und MSC-basierten Chondrozyten stimuliert und waren somit im Einklang mit unseren Vorarbeiten mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe (Hecht et al. 2019). Die Mechanoinduktion dieser miRs wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig für humane MSC-basierte Chondrozyten beschrieben und sind ein weiteres Argument für die Ähnlichkeit von Mechanotransduktionsmechanismen in beiden Knorpelersatzgeweben.

5.5 Evaluierung von Mechanoadaptierungsparametern in Knorpelersatzgewebe

In der vorliegenden Arbeit reagierten AC und MSC-basierte Chondrozyten trotz gleichem GAG-Gehalt und vergleichbarer Härte mit einer unterschiedlichen Regulation der EZM-Synthese. Während AC, wie erwartet, an Tag 21 mit einem Erhalt und an Tag 35 mit einer Steigerung der GAG-Synthese bei einem Erhalt der Kollagensynthese auf die Belastung reagierten, antworteten MSC-basierte Chondrozyten mit einer signifikanten Reduktion der GAG-Synthese an beiden Zeitpunkten und der Kollagensynthese an Tag 21, obwohl der in Vorarbeiten mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe bestimmte Schwellenwert für eine belastungsinduzierte Steigerung der GAG-Synthese von 600 µg GAG/Probe in 7 von 10 MSC-Proben erreicht wurde. Somit schien der GAG-Gehalt in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe, anders als in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe, nicht der kritische Faktor für die Regulation der belastungsinduzierten EZM-Synthese zu sein. Möglich ist jedoch auch, dass MSC, die erst durch die Kulturbedingungen zu Chondrozyten heranreifen, einen höheren GAG-Gehalt als AC benötigen würden, um wie AC mit einem Erhalt oder einer Steigerung der GAG-Synthese auf die Belastungsepisode reagieren zu können.

In Vorarbeiten mit AC-basiertem Knorpelersatzgewebe zeigte sich eine Stimulation der SOX9-Expression bei dem auch in dieser Arbeit verwendeten physiologischen Belastungsprotokoll bei gleichzeitiger Stimulation der GAG-Synthese an Tag 35 (Hecht et al. 2019; Scholtes et al. 2018). Auch an Tag 21 wurde eine Stimulation von SOX9 beobachtet, jedoch ging dies nicht mit einer Regulation der GAG-Synthese einher (Praxenthaler et al. 2018). Eine Reduktion der SOX9-Expression erfolgte in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe an Tag 21 unter Verwendung eines hyperphysiologischen katabolen Belastungsprotokolls, was mit einer Reduktion der GAG-Synthese einherging (Hecht et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde eine variable Stimulation der SOX9-Expression auf mRNA- und Proteinebene in MSC-basierten Chondrozyten in Antwort auf das für AC anabole Belastungsprotokoll beobachtet, die im Mittelwert keine Regulation durch die Belastung zeigte. Gleichzeitig trat eine reduzierte GAG-Synthese nach Belastung auf. SOX9 wird durch den TGF- β - und BMP-Signalweg stimuliert (Dexheimer et al. 2016; Healy et al. 1999; Hellingman et al. 2011; Thielen et al. 2019) und kann durch den NF κ B-Signalweg inhibiert werden (Murakami et al. 2000; Sitcheran et al. 2003). In der Tat stimulierte eine NF κ B-Inhibition die basalen SOX9-Proteinspiegel in MSC-basierten Chondrozyten, eine robuste Stimulation von SOX9 unter Belastung wurde jedoch nicht installiert. Somit bleibt offen, welche Signalwege an der variablen SOX9-Regulation nach Belastung von MSC-basierten Chondrozyten beteiligt sind.

5.5.1 Einfluss von anabolen Signalwegen auf die EZM-Synthese

In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob anabole Signalwege als Mechanoadaptierungsparameter in AC und MSC-basierten Chondrozyten gleichermaßen durch die Belastung reguliert wurden. Als Kandidaten wurden der TGF- β - und BMP-Signalweg gewählt, die im Knorpel maßgeblich an der Produktion von Matrixmolekülen beteiligt sind. Wie aus Vorarbeiten bekannt war, wurde weder eine Stimulation der pSMAD2-Spiegel noch der pSMAD1/5-Spiegel durch die gewählte Belastungsepisode beobachtet, obwohl die GAG-Synthese in AC an Tag 35 und die *BMP2*- und *BMP6*-Expression signifikant stimuliert waren. Auch MSC-basierte Chondrozyten reagierten hier auf die Belastung nicht mit einer Regulation der pSMAD2- und pSMAD1/5-Spiegel, obwohl auch hier *BMP2* und *BMP6* durch die Belastung stimuliert waren. In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse zur belastungsinduzierten Regulation von pSMAD2/3 in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Eine Studie bestätigt, dass pSMAD2/3 nicht durch mechanische Belastung reguliert ist (Aisenbrey und Bryant 2019), jedoch wurde auch ein supprimierender Effekt der Belastung auf pSMAD2/3 beobachtet (Zhang et al. 2015). Da jedoch unterschiedliche Belastungsprotokolle und Kulturbedingungen verwendet wurden, sind die beschriebenen Effekte der Belastung nicht direkt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar. In der Literatur wurde eine Inhibition von pSMAD1/5/9 beschrieben (Aisenbrey und Bryant 2019; Zhang et al. 2015), was im Widerspruch zu der ausbleibenden Regulation von pSMAD1/5/9 in der vorliegenden Arbeit steht. Auch hier lassen sich diese Studien mit der vorliegenden Arbeit nicht direkt vergleichen, da unterschiedliche Kulturbedingungen und Belastungsprotokolle verwendet wurden.

Dass pSMAD2 in dieser Arbeit nicht durch die Belastung reguliert war, könnte daran liegen, dass dieses bereits durch die kontinuierliche Kultur in TGF- β -haltigem Medium so stark stimuliert wurde, dass selbst unter einer zusätzlichen BMP-Expression keine zusätzliche Stimulation sichtbar war. Dass pSMAD1/5/9 in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Belastung reguliert war, kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Zwar induzierte die Belastung die Expression der beiden Liganden *BMP2* und *BMP6*, jedoch könnte die hohe TGF- β -Konzentration im Medium BMP-induzierte Effekte maskieren (Aisenbrey und Bryant 2016; Aisenbrey und Bryant 2019; Steinmetz und Bryant 2012). Des Weiteren wurde nicht untersucht, ob sich die erhöhte *BMP2*- und *BMP6*-Expression innerhalb der dreistündigen Belastung erfolgreich auf Proteinebene übersetzt hat und eine Sekretion der Liganden für eine autokrine Rezeptorstimulation stattgefunden hat. Um Defizite in der EZM-Synthese MSC-basierter Chondrozyten nach Belastung abzumildern, wurde jedoch die *BMP6*-Konzentration im Medium durch Zugabe von rekombinantem humanem *BMP6* erhöht. Eine Inhibition des BMP-Signalwegs sollte dessen Beitrag in der Aufrechterhaltung der EZM-Syntheseleistung von AC entschlüsseln. In früheren Studien unserer Gruppe wurde gezeigt, dass die GAG-Ablagerung in MSC-Pellets unter Beteiligung des BMP-Signalwegs erfolgte (Dexheimer et al. 2016) und dass eine

Stimulation von Pellets mit MSC aus Fettgewebe mit BMP6 in einer gesteigerten GAG-Ablagerung resultierte (Hennig et al. 2007). Weder reagierten MSC-basierte Chondrozyten auf die gesteigerte BMP6-Konzentration mit einer Steigerung der EZM-Synthese, noch wurde eine Inhibition der GAG-Synthese in AC erzielt, so dass der BMP-Signalweg keine kritische Rolle in der EZM-Syntheseleistung nach Belastung spielte. Dies könnte durch die hohe TGF- β -Verfügbarkeit im chondrogenen Medium bedingt sein, da eine hohe Aktivität des TGF- β -Signalwegs mögliche Effekte des BMP-Signalwegs maskieren könnte.

Demzufolge hatten die beiden wichtigen anabolen Signalwege TGF- β und BMP keinen kritischen Einfluss auf die belastungsinduzierte Regulation der EZM-Synthese, dem Hauptzielparameter der Mechanoadaptation in dieser Arbeit. Da katabole Signalwege die Mechanoadaptation beeinflussen könnten, wurden ausgewählte katabole Signalwege und aktive Moleküle näher untersucht.

5.5.2 Einfluss von katabolen Signalwegen auf die EZM-Synthese

5.5.2.1 Einfluss von NF κ B auf die EZM-Synthese

Da NF κ B mit katabolen Effekten auf Knorpelgewebe assoziiert ist (Marcu et al. 2010), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob unterschiedliche NF κ B-Spiegel in AC versus MSC-basierten Chondrozyten vorlagen und ob NF κ B durch mechanische Belastung aktiviert wurde. Es konnten jedoch weder unterschiedliche NF κ B-Spiegel, noch eine Mechanoinduktion von p65 in AC und MSC-basierten Chondrozyten beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass die gewählte Analyse der NF κ B-Spiegel mittels Western Blot nicht die optimale Methode für eine Detektion von NF κ B darstellte. In anderen Studien wurde vielmehr eine Translokation von NF κ B-Transkriptionsfaktoren in den Nukleus evaluiert. Wir wählten für die Detektion mittels Western Blot einen p65-Antikörper, mit dem spezifisch aktives p65 detektiert werden sollte, um den NF κ B-Nachweis mittels Western Blot zu ermöglichen. Jedoch war es technisch schwierig, einen zufriedenstellenden p65-Nachweis mittels Western Blot zu erhalten. Eine vergleichende Analyse der aktiven p65-Spiegel in der zytosolischen vs. der Kernphase könnte zukünftig einen besseren p65-Nachweis ermöglichen, sofern der verwendete Kollagen I/III-Träger eine Isolation der Kernphase erlaubt. Eine Belastungsinduktion von NF κ B wurde bislang nur in wenigen Studien mit Knorpelersatzgewebe untersucht. So zeigte sich eine leichte Erhöhung der phosphorylierten I κ B α -Spiegel nach 15-30 min dynamischer Kompression (30 %) von C3H10T1/2-Zellen in einem poly(ϵ -Caprolacton)-Träger (Nam et al. 2009). Eine nukleare Translokation von NF κ B wurde nur bei paralleler Stimulation mit IL1- β für bovine Chondrozyten in Agaroseträgern, die einer geringen Belastung von 0-15% Kompression ausgesetzt wurden, berichtet (Akanji et al. 2010). Somit bleibt zwar auch unter Einbezug der vorliegenden Daten offen, ob p65 durch mechanische Belastung in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe

stimuliert werden kann, jedoch weist die gesteigerte belastungsinduzierte EZM-Synthese unter NFκB-Inhibition darauf hin, dass der NFκB-Signalweg durch mechanische Belastung induziert wurde.

Da NFκB mit katabolen Effekten assoziiert ist (Marcu et al. 2010), sollte der Einfluss von NFκB auf die EZM-Synthese mithilfe einer NFκB-Inhibition untersucht werden. Eine Inhibition mittels Bay11-7082, einem gängigen NFκB-Inhibitor, am Tag 21 konnte die belastungsinduzierte Reduktion der GAG- und Kollagensynthese abmildern und bewies somit einen inhibierenden Einfluss von NFκB auf die belastungsinduzierte EZM-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten. Zwar wurde in der Literatur schon eine Korrelation zwischen der Mechanoinduktion von NFκB und der Reduktion des EZM-Gehalts oder der Expression chondrogener Marker in Chondrozyten beschrieben (Anghelina et al. 2008; Deschner et al. 2003), ein kausaler Zusammenhang wurde bislang jedoch noch nicht gezeigt. Demzufolge wurde in dieser Arbeit erstmals ein Beitrag des NFκB-Signalwegs zur Mechanoadaptation von MSC-basierten Chondrozyten berichtet, was einen wichtigen Schritt zur Entschlüsselung der Mechanismen der Mechanoadaptation in Knorpelersatzgewebe darstellt. Eine gezielte Inhibition von NFκB könnte dazu dienen, Tissue Engineering Ansätze zur Herstellung von funktionellem Knorpelersatzgewebe basierend auf MSC zu verbessern.

Um herauszufinden, durch welchen Mechanismus die Reduktion der EZM-Synthese unter NFκB-Inhibition abgemildert wurde, wurden die Proteinspiegel des wichtigen chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX9 analysiert. Durch die NFκB-Inhibition wurden die basalen Spiegel von SOX9 auf Proteinebene in zwei der drei untersuchten Spenderpopulationen erhöht, was möglicherweise einen positiven Effekt auf die belastungsinduzierte EZM-Synthese haben könnte. Jedoch zeigten sich keine signifikant höheren basalen EZM-Syntheseraten unter NFκB-Inhibition. Außerdem waren die SOX9-Spiegel nach Belastung variabel reguliert, so dass keine AC-typische belastungsinduzierte SOX9-Stimulation erreicht wurde. Zwar ist ein inhibierender Effekt von NFκB auf SOX9 in der Literatur bekannt (Murakami et al. 2000; Sitcheran et al. 2003), jedoch konnte dieser in der vorliegenden Studie nicht eindeutig anhand der hier verwendeten Fallzahl bestätigt werden. Ferner wurde auch kein Unterschied der mechanosensitiven Gene und chondrogenen Marker unter NFκB-Inhibition beobachtet. Dass die NFκB-Zielgene *FOS* (Li et al. 2004), *COX2* (Ackerman et al. 2008; Kaltschmidt et al. 2002; Yamamoto et al. 1995) und *BMP2* (Feng et al. 2003; Fukui et al. 2006) nicht durch die NFκB-Inhibition beeinflusst wurden, könnte auch bedeuten, dass der verwendete NFκB-Inhibitor Bay11-7082 keine hochpotente Inhibition des NFκB-Signalwegs erlaubte, was jedoch der Milderung der belastungsinduzierten Reduktion der EZM-Synthese und der gesteigerten SOX9-Proteinspiegel in zwei von drei Spenderpopulationen widerspricht. Naheliegend ist, dass die mechanosensitiven Gene unter Belastung durch den Beitrag weiterer Signalwege ergänzend stimuliert wurden. Da die NFκB-Inhibition auf Genexpressionsebene im Gegensatz zur Proteinebene nicht zu einer Steigerung der basalen SOX9-Spiegel führte, deutet dies an, dass

der NFκB-Signalweg SOX9 nicht auf transkriptionaler, sondern auf der posttranskriptionalen Ebene inhibiert. Auch die abgemilderte Senkung der Kollagensynthese bei unveränderter belastungsinduzierter Reduktion der *COL2A1*-Expression unter NFκB-Inhibition weist darauf hin, dass der NFκB-Signalweg die Kollagensynthese nicht auf der Transkriptionsebene inhibiert und dass andere Signalwege an der gesenkten *COL2A1*-Expression durch Belastung beteiligt sein müssen. Zukünftig gilt es, den exakten Mechanismus, wie NFκB die EZM-Synthese hemmt, zu entschlüsseln.

5.5.2.2 Einfluss von NO auf die EZM-Synthese

Die dreistündige Belastungsepisode stimulierte die NO-Produktion in AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Eine belastungsinduzierte Produktion von NO wurde bereits für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe berichtet. So zeigte eine Studie von Gardner et al., dass MSC in einem Fibrinträger nach kombinierter dynamischer Scher- ($\pm 25^\circ$, 1 Hz) und Kompressionsbelastung (10 % + 10 % Vorkompression, 1 Hz, 1 h/Tag, Tag 2-7) mit einer signifikanten NO-Produktion an Tag 2, 4, 6 und 8 reagierten (Gardner et al. 2016). Zwar wurde NO in der Literatur vorwiegend als kataboler Signalweg beschrieben, allerdings zeigte sich eine belastungsinduzierte Stimulation von NO sowohl in AC, die nach Belastung an Tag 21 die GAG-Synthese aufrechterhielten, als auch in MSC-basierten Chondrozyten, die mit einer Reduktion der GAG-Synthese reagierten. Eine Studie von Taskiran et al. zeigte, dass eine IL1-vermittelte Reduktion der GAG-Synthese in Kaninchenknorpelimplantaten durch Inhibition von NO abgemildert werden konnte (Taskiran et al. 1994). Da mechanische Belastung und IL1 wahrscheinlich nicht die gleichen Wirkmechanismen haben und weil ein anderes System verwendet wurde, lässt sich die vorliegende Arbeit nicht mit der Studie von Taskiran et al. vergleichen. In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse zu der Frage, ob eine belastungsinduzierte NO-Stimulation mit einer Steigerung (Das et al. 1997) oder einem Verlust von GAG (Fioravanti et al. 2010) korreliert. Basierend auf den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit scheint eine Stimulation von NO durch Belastung ein generelles Merkmal der Mechanoantwort von AC und MSC-basierten Chondrozyten zu sein, das nicht in direkter Regulation zur GAG-Synthese steht.

5.5.3 Einfluss von Signalwegen mit anaboler und kataboler Wirkung auf die EZM-Synthese

5.5.3.1 Einfluss von COX2/PGE₂ auf die EZM-Synthese

Im Rahmen der Analyse der Expression mechanosensitiver Gene in AC und MSC-basierten Chondrozyten fiel auf, dass beide mit einer Stimulation der COX2-Expression reagierten und

auch die PGE₂-Konzentration im konditionierten Medium beider Zelltypen signifikant durch die Belastung erhöht wurde. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Mechanoinduktion von COX2/PGE₂ in MSC-basierten Chondrozyten berichtet. Ein Vergleich der basalen Expressionsspiegel der mechanosensitiven Gene zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten zeigte eine signifikant höhere basale BMP2- und COX2-Expression in MSC-basierten Chondrozyten, während für SOX9 keine signifikanten Unterschiede erhalten wurden. Während der Arthroseentstehung ist die BMP2-Expression im Knorpel erhöht und kann die Expression von Aggrecanasen induzieren, was einen remodellierenden Effekt auf die Knorpelmatrix ausübt (Blaney Davidson et al. 2007). COX2 wird ebenfalls in Arthroseknorpel vermehrt exprimiert und der COX2/PGE₂-Signalweg ist mit katabolen Vorgängen im Arthroseknorpel, insbesondere mit der Degradation der Knorpelmatrix, assoziiert. Die Literatur zu PGE₂ liefert jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Relevanz von PGE₂ in der Knorpelmatrixsynthese (Guilak et al. 2004). In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die Chondrogenese mesenchymaler Kulturen von Hühner-Extremitätsknospen förderte (Biddulph et al. 1991; Biddulph et al. 2000; Capehart und Biddulph 1991; Gay und Kosher 1984; Kosher und Walker 1983). Eine *in vitro* Studie mit klassischer MSC-Pelletkultur zeigte, dass PGE₂ zur GAG-Ablagerung beitrug (Pountos et al. 2021).

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass BMP2 und PGE₂ sich gegenseitig stimulieren (Haversath et al. 2012; Li et al. 2014; Nakagawa et al. 2007). BMP2 und PGE₂ können nachgeordnet die gleichen Signalwege, nämlich den cAMP/PKA- und MAPK-Signalweg, aktivieren (Haversath et al. 2012). Die erhöhte BMP2 und COX2-Expression in MSC-basierten Chondrozyten könnte demnach auf erhöhte katabole Vorgänge durch Beteiligung des cAMP/PKA-Signalwegs hindeuten, der auch als wichtiger nachgeordneter Mediator des PTHrP-Signalwegs bekannt ist. Ein Vergleich der PGE₂-Spiegel wies deutlich höhere Konzentrationen in MSC-basierten Chondrozyten vs. AC nach und bestätigte somit, dass sich die höhere COX2-Expression in MSC-basierten Chondrozyten auch auf eine höhere PGE₂-Produktion übersetzte. Jedoch wurde kein Unterschied in der basalen EZM-Synthese zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten beobachtet, was einen generellen katabolen Effekt von PGE₂ nicht bekräftigen konnte. Vielmehr wurde eine hohe PGE₂-Konzentration als ein generelles Charakteristikum der Kultur von MSC unter chondrogenen Bedingungen bewertet, da auch im Verlauf der Pelletkultur ab Tag 14 deutlich höhere PGE₂-Spiegel im Vergleich zu AC unter den gleichen Kulturbedingungen beobachtet wurden. Andere Studien zeigten unterschiedliche PGE₂-Spiegel zwischen AC, die in einem Träger kultiviert wurden und MSC in Pelletkultur (Pountos et al. 2011; Pountos et al. 2021), so dass die vorliegende Arbeit die erste ist, die diesen Unterschied zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten unter den gleichen Kulturbedingungen beschreibt. Wodurch die höheren PGE₂-Spiegel in MSC-basierten Chondrozyten bedingt sind, gilt es zukünftig herauszufinden. Möglicherweise könnte die Hypertrophie MSC-basierter Chondrozyten, die sich ab Tag 14 bereits in Form von signifikant höheren Expressionsspiegeln

hypertropher Marker wie *COL10A1* im Vergleich zu AC abzeichnet (Pelttari et al. 2006), eine Rolle spielen.

5.5.3.2 Einfluss von PTHrP/cAMP/PKA auf die EZM-Synthese

Eine Stimulation des PKA-Signalwegs durch Belastung wurde im Rahmen einer näheren Betrachtung des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs untersucht. Die dreistündige Belastungsepisode induzierte die Expression von *PTH LH* in AC- und MSC-basierten Chondrozyten. Erstmals konnte die belastungsinduzierte Stimulation von *PTH LH* in humanen MSC-basierten Chondrozyten beobachtet werden und somit die für Dehnungsreize bekannte Mechanosensitivität von *PTH LH* auch für diesen Zelltyp gezeigt werden. Außerdem ist diese Arbeit die erste Studie, die eine Stimulation von *PTH LH* durch zyklische Kompression in humanen Chondrozyten berichtet. Belastungsinduzierte Effekte konnten teilweise durch eine Stimulation von nicht-belasteten Proben mit PTHrP(1-34) oder dem synthetischen cAMP Analog dbcAMP, einem nachgeordneten Mediator des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs, imitiert werden. So wurde das bekannte PTHrP-Zielgen, der pro-hypertrophe Transkriptionsfaktor *MEF2C* (Browe et al. 2019; Dreher et al. 2020), sowie *BMP6* und *FOS* in allen drei Gruppen stimuliert, was andeutete, dass PTHrP einen Beitrag zur belastungsinduzierten Regulation dieser Gene haben könnte. In dieser Arbeit war eine Identifikation der von den Zellen produzierten PTHrP-Isoformen auf Proteinebene technisch nicht möglich, so dass nicht bekannt ist, ob und welche PTHrP-Isoformen von den Zellen in Reaktion auf Belastung auf Proteinebene produziert wurden. Da das in dieser Arbeit verwendete PTHrP(1-34), welches ausschließlich den Gas-Weg aktiviert, belastungsinduzierte Effekte nicht vollständig imitieren konnte, ist naheliegend, dass die Zellen auch andere PTHrP-Isoformen produzieren, über die beispielsweise der PKC-Signalweg und der Ca^{2+} -Signalweg aktiviert werden könnten. In der Literatur ist bekannt, dass PTHrP-Isoformen unterschiedlicher Länge auch die Dauer der Signalaktivierung beeinflussen. So wurde gezeigt, dass der PTHrP(1-141)/PTH-Rezeptorkomplex von Osteoblasten durch Endozytose internalisiert werden kann, was zu einem andauernden cAMP-Signal im Endosom führte. Bei der Verwendung von PTHrP(1-34) wurde keine Endozytose beobachtet und die cAMP-Produktion stoppte, sobald PTHrP(1-34) entfernt wurde. Dieser Effekt spiegelte sich auch bei der Regulation der PTHrP-Zielgene *IL6* und *RANKL* wider, deren Induktion unter PTHrP(1-141) länger andauerte als unter PTHrP(1-34) (Ho et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde die Endozytose nicht untersucht, so dass offen bleibt, ob dieser Mechanismus durch die Belastung eingeleitet wurde. Des Weiteren wurden durch die Belastung auch weitere Signalmoleküle wie NO- und $COX2/PGE_2$ aktiviert, so dass eine vollständige Imitation der Belastungsantwort MSC-basierter Chondrozyten durch PTHrP(1-34) nicht erwartet wurde.

Neben dem PTHrP-Signalweg kann auch der PGE_2 -Signalweg die cAMP-Produktion aktivieren (Haversath et al. 2012), so dass nicht klar ist, ob die gesteigerte cAMP-Produktion unter

Belastung über den PTHrP- oder den PGE₂-Signalweg vermittelt wird. Da beide Signalwege durch die Belastung stimuliert wurden, ist ein Beitrag beider Signalwege zur belastungsinduzierten cAMP-Produktion wahrscheinlich. Eine Inhibition des PGE₂-Signalwegs könnte Aufschluss über dessen Rolle in der belastungsinduzierten Aktivierung der cAMP-Produktion geben, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt, da PGE₂ auch in AC signifikant durch die Belastung stimuliert wurde, so dass eine mechanosensitive Stimulation von PGE₂ nicht mit katabolen Effekten korrelierte.

Eine Inhibition des PTH-Rezeptors mittels PTHrP(7-34) zeigte keinen überzeugenden Effekt auf die GAG-Synthese unter Belastung. Daher wurde ein Adenylylcyclase-Inhibitor, MDL-12,330A, verwendet. Die Adenylylcyclase katalysiert die cAMP-Produktion und ist einer PTH-Rezeptoraktivierung nachgeschaltet. Die Inhibition der Adenylylcyclase resultierte in einer Verringerung der belastungsinduzierten Reduktion der GAG-Synthese in MSC-basierten Chondrozyten. Da der Inhibitor der Adenylylcyclase die belastungsinduzierte Stimulation von cAMP jedoch nicht abmildern konnte, könnte dies auf eine zu geringe Sensitivität des verwendeten ELISAs hinweisen. Möglich ist auch, dass der Inhibitor eine ohnehin schon niedrige cAMP-Konzentration nicht weiter reduzieren konnte. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass MDL-12,330A geringe, basale cAMP-Konzentrationen nicht weiter verringerte. So reduzierten Johnson et al. eine durch Flüssigkeitsscherbelastung induzierte cAMP-Konzentration in C3H10T1/2-Zellen mithilfe von 10 µM MDL-12,330A, wobei die basale cAMP-Konzentration, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, nicht durch den Inhibitor reduziert wurde (Johnson et al. 2018). Des Weiteren könnten noch andere Mechanismen an der belastungsinduzierten cAMP-Produktion beteiligt sein. Neben Gas kann die Adenylylcyclase auch über andere Moleküle aktiviert werden, darunter intrazelluläres Ca²⁺ (Hofer 2012), welches als mechanosensitiv beschrieben ist (Lee et al. 2017) und auch über PTHrP induziert werden kann (Martin 2016). Unter physiologischer Belastung übte Ca²⁺ über *Transient Receptor Potential Vanilloid 4* (TRPV4)-Ca²⁺-abhängige Ionenkanäle eine anabole Wirkung auf Chondrozyten aus, während Piezo1/2-Kanäle in die Mechanotransduktion unter hyperphysiologischer Belastung involviert waren (Lee et al. 2017). Ob Ca²⁺ auch unter den hier verwendeten Bedingungen durch die Belastung induziert wurde und ob dies zur differenziellen Regulation der EZM-Synthese in AC vs. MSC-basierten Chondrozyten beitrug, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht geprüft, sollte aber in zukünftigen Studien untersucht werden. Letztlich lässt sich nicht ausschließen, dass MDL-12,330A unter Belastung keine ausreichende Aktivität hatte, obwohl diese zuvor in einer Konzentrationsreihe vor der Anwendung bei Belastung überprüft wurde. Somit konnten in dieser Arbeit Hinweise gefunden werden, dass der PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg an der Reduktion der EZM-Synthese nach Belastung beteiligt ist. Weitere Studien mit höherer Fallzahl sind jedoch nötig, um die Aussagekraft der in dieser Arbeit erhaltenen Resultate zu verstärken.

5.6 Einfluss mechanischer Belastung auf den Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten

Die dreistündige Belastungsepisode reduzierte die bekannten hypertrophen Marker *COL10A1*, *MEF2C* und *IHH*, sowie die osteogenen Marker *ALPL* und *IBSP* in MSC-basierten Chondrozyten an Tag 21. Dies ging jedoch mit einer signifikanten belastungsinduzierten Reduktion der *COL2A1*-Expression einher und eine Normalisierung auf *COL2A1* löschte die meisten Regulationen aus. Nur *PTH1R* blieb nach der Normalisierung auf den Differenzierungsstatus stimuliert und *PTH1R* an Tag 21 reduziert. Somit inhibierte die einmalige Anwendung des Belastungsprotokolls nicht spezifisch den hypertrophen Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten, sondern allgemein die Differenzierung der Zellen. In der Literatur sind für den Effekt mechanischer Belastung auf Differenzierung und Hypertrophie vielfältige Ergebniskombinationen zu finden. So wurde eine Reduktion der Differenzierung und Hypertrophie, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall ist, nur in einer Studie beobachtet (Steinmetz und Bryant 2011). Andere Studien zeigten keinen Effekt auf die Differenzierung, aber eine reduzierte Hypertrophie (Aisenbrey und Bryant 2016; Aisenbrey und Bryant 2019), eine Steigerung von Differenzierung und Hypertrophie (Jahangir et al. 2020), eine Steigerung der Differenzierung und keinen Effekt auf die Hypertrophie (Guo et al. 2016; Li et al. 2010; Sawatjui et al. 2018), eine Steigerung der Differenzierung unter reduzierter Hypertrophie (Steinmetz et al. 2015; Zhang et al. 2015) und eine Steigerung der Hypertrophie unter reduzierter Differenzierung (Steinmetz und Bryant 2012). Außerdem gibt es Arbeiten, in denen kein signifikanter Effekt der Belastung auf Differenzierung und Hypertrophie ersichtlich war (Campbell et al. 2006; McDermott et al. 2021). Diese Vielfalt an unterschiedlichen Effekten lässt sich durch die verschiedenen Kulturbedingungen und verwendeten Belastungsprotokolle erklären. Somit hatte die hier verwendete dreistündige Belastungsepisode keinen spezifischen anti-hypertrophen Effekt, sondern stoppte die Differenzierung MSC-basierter Chondrozyten.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die eine Mechanoinduktion von *PTH1R* in AC und MSC-basierten Chondrozyten nach zyklischer Kompression zeigt. In der Literatur wurde ein Beitrag von PTHrP in einer Hypoxie-induzierten Reduktion der Hypertrophie gezeigt (Browe et al. 2019). Da PTHrP die Differenzierung regulieren kann (Fischer et al. 2014; Mueller et al. 2013; Weiss et al. 2010), wurde die Hypothese geprüft, dass die belastungsinduzierte Reduktion der Differenzierung als Folge einer PTHrP-Stimulation auftritt. In dieser Arbeit konnte jedoch eine Stimulation von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe mit PTHrP(1-34) oder dbcAMP die belastungsinduzierte Inhibition von *COL2A1* nicht simulieren, so dass die Hypothese nicht erfüllt wurde und weitere Signalwege an der Hemmung der Differenzierung durch mechanische Belastung beteiligt sein müssen. Weiterführende Inhibitionsexperimente mit höherer Fallzahl oder ein *PTH1R*-Knockdown könnten dazu dienen, den Einfluss des PTHrP-Signalwegs auf den Zellphänotyp MSC-basierter Chondrozyten vollständig zu entschlüsseln.

5.7 Limitierungen der Studie

Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von nativem, gesundem Knorpel wurden in der vorliegenden Arbeit AC aus makroskopisch intaktem Knorpel des Tibiaplateaus und der Femurkondylen von OA-Patient*innen verwendet. Trotz großer Sorgfalt bei der Isolation der Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der OA-Hintergrund der Zellen die Antwort auf mechanische Belastung beeinflusst haben könnte. Die verwendeten AC reagierten nach 21 Tagen mit einem Erhalt und nach 35 Tagen mit einer Steigerung der GAG-Synthese und antworteten somit wie für native AC erwartet auf das verwendete physiologische Belastungsprotokoll. Solange jedoch keine vergleichende Analyse mit AC aus Knorpel gesunder Spender vorliegt, sollte der OA-Hintergrund der Zellen beachtet werden.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nur anhand eines Belastungsprotokolls, das in Vorarbeiten etabliert und als physiologisch bewertet wurde, untersucht. Somit bleibt offen, ob AC vs. MSC-basierte Chondrozyten auch bei der Verwendung anderer Belastungsprotokolle eine ähnliche Mechanotransduktion und eine unterschiedliche Mechanoadaptierung aufweisen würden. Möglicherweise könnte eine Verringerung der Kompressionsstärke, Frequenz und/oder Belastungsdauer MSC-basierten Chondrozyten eine anabole Belastungsantwort ermöglichen. Besonders interessant könnte ein Vergleich zwischen AC und MSC-basierten Chondrozyten bei Anwendung eines Belastungsprotokolls sein, für das bereits bekannt ist, dass MSC-basierte Chondrozyten mit einer Stimulation chondrogener Marker reagieren (Pelaez et al. 2009; Sawatjui et al. 2018; Schatti et al. 2011). Dabei sollte geprüft werden, ob MSC-basierte Chondrozyten auch unter den für sie physiologischen Bedingungen den AC bezüglich der EZM-Synthese unterlegen sind. Eine vergleichende Analyse der Mechanotransduktion und Mechanoadaptierung beider Zelltypen bei Belastungsprotokollen mit unterschiedlichen Effekten auf die EZM-Synthese könnte es erlauben, allgemeine mechanosensitive Zellreaktionen von solchen, die spezifisch mit katabolen oder anabolen Prozessen in Verbindung stehen, zu identifizieren. Dies würde ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen und Einflussfaktoren der Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe ermöglichen.

Ein weiterer Faktor, der die Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe beeinflussen könnte, sind hypoxische Bedingungen, die für nativen Gelenknorpel physiologisch sind. So wurde gezeigt, dass die mechanosensitive NO- und PGE₂-Produktion in porcinen Knorpelimplantaten nur unter normoxischen Bedingungen erfolgte, während unter Hypoxie keine Stimulation von NO und PGE₂ beobachtet werden konnte (Fermor et al. 2005). Eine Inhibition der NOS2 konnte die Stimulation von PGE₂ jedoch wieder installieren, was für NO nicht der Fall war, so dass PGE₂ eher von der NO-Konzentration als von der Sauerstoffkonzentration abhängig zu sein schien. Ob auch weitere mechanosensitive Moleküle und

Prozesse durch die limitierte Sauerstoffverfügbarkeit bei Hypoxie im Gelenkknorpel beeinflusst werden, ist noch nicht entschlüsselt und es ist unklar, welchen Einfluss dies auf die Mechano-transduktion und Mechanoadaptation von AC- und MSC-basierten Chondrozyten haben könnte. Daher gilt es zukünftig, die Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe auch unter Hypoxie zu untersuchen, um die physiologischen Bedingungen im Gelenk noch besser zu simulieren.

5.8 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Rolle von Zellherkunft und Signalkaskaden für die Mechanokompetenz von Knorpelersatzgewebe aufgeklärt. AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe zeigten zwar nahezu gleiche Mechanokopplungs- und Mechano-transduktionsparameter, jedoch reagierten MSC-basierte Chondrozyten empfindlicher als AC auf das dreistündige physiologische Belastungsprotokoll und zeigten eine gestörte Mechanoadaptation in Form einer reduzierten EZM-Synthese. Somit erwarben MSC in gängigen Differenzierungsverfahren nicht die Mechanokompetenz von AC. Eine Untersuchung der Rolle der für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe bekannten anabolen Signalkaskaden TGF- β und BMP, sowie von Signalkaskaden mit kataboler (NF κ B und NO) oder variabler (PGE₂ und PTHrP) Wirkung, legte einen Beitrag des NF κ B- und des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs in der differentiellen Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe nahe. Eine Inhibition kataboler Einflüsse des NF κ B-Signalwegs war eine wichtige Maßnahme, um die basalen Spiegel des bedeutenden chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX9 in MSC-basierten Chondrozyten zu steigern und eine Aufrechterhaltung der EZM-Synthese unter Belastung zu installieren. Eine Inhibition kataboler Beiträge des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs stellte eine weitere interessante Strategie dar, um die reduzierte EZM-Synthese nach Belastung in MSC-basierten Chondrozyten abzumildern.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können nun dazu genutzt werden, die Mechanokompetenz von Knorpelersatzgewebe zu verbessern und funktionelles Gewebe für neue Therapieansätze zu züchten sowie um pharmakologische Unterstützungsmaßnahmen zum Wohle der Patient*innen zu etablieren. Zukünftige Untersuchungen sollten den Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die Mechanokompetenz von Knorpelersatzgewebe, insbesondere hinsichtlich der Rolle von COMP, sowie die molekularen Mechanismen der variablen SOX9-Regulation in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe im Fokus behalten.

6 Zusammenfassung

Da Knorpelgewebe eine limitierte intrinsische Regenerationskapazität hat, sind operative Interventionen zur Therapie von Knorpelschäden oftmals unerlässlich. Aktuelle Therapieoptionen bieten jedoch häufig keine langfristig zufriedenstellenden Ergebnisse, so dass der Einsatz von Gelenkprothesen meist unvermeidbar ist. Diese bieten, anders als vitales Gewebe, jedoch keine Anpassungsmöglichkeiten an ihre mechanische Umgebung. Einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung von vitalem Knorpelersatzgewebe stellt das Tissue Engineering dar. Allerdings muss sichergestellt werden, dass das *in vitro* gezüchtete Knorpelersatzgewebe auch eine knorpeltypische Mechanokompetenz erwirbt, um die Homöostase des Gewebes gewährleisten zu können. Das bedeutet, dass die Aspekte der Mechanokopplung im Gewebe, der Mechanotransduktion der Reize ins Zellinnere und ihre Übersetzung in intrazelluläre Signale, sowie der Mechanoadaptation denen von nativem Knorpelgewebe entsprechen sollten. Ob mesenchymale Stromazellen (MSC), die aufgrund ihrer leichten Isolierbarkeit, hohen Proliferationskapazität und chondrogenen Differenzierbarkeit eine vielversprechende Zellquelle für die Züchtung von Knorpelersatzgewebe darstellen, die gleiche Mechanokompetenz entwickeln wie artikuläre Chondrozyten (AC), war nicht bekannt. Daher verfolgte diese Arbeit das Ziel, die Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu vergleichen. In dieser Studie konnte qualitativ hochwertiges AC- und MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe mit vergleichbaren Mechanokopplungsparametern, basierend auf einem vergleichbaren Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalt und gleicher Härte, die der von nativem Knorpel nahekam, hergestellt werden. Dies erlaubte eine vergleichende Untersuchung der Rolle der Zellherkunft für die Mechanotransduktion und Mechanoadaptation in Knorpelersatzgewebe. AC und MSC-basierte Chondrozyten reagierten auf eine dreistündige, für AC zuvor als physiologisch bewertete zyklische Kompressionsepisode, die dreistündiges Gehen in 10-min Intervallen imitierte, mit einer gleichartigen Stimulation der Mechanotransduktionsparameter pERK1/2, der Expression mechanosensitiver Gene, mit Ausnahme von SOX9, und von microRNAs. Dabei konnte erstmals eine Mechanoinduktion gängiger mechanosensitiver Gene auch für humanes MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe gezeigt werden. Ferner wurde erstmals eine Mechanostimulation ausgewählter microRNAs in MSC-basierten Chondrozyten belegt. Zum ersten Mal wurden die GAG- und Kollagensynthese in MSC-basierten Chondrozyten nach zyklischer Kompression bestimmt und ein Vergleich zu AC zeigte, dass MSC-basierte Chondrozyten empfindlicher auf das gewählte physiologische Belastungsprotokoll reagierten. Somit ergaben sich für MSC-basierte Chondrozyten bei ähnlicher Mechanotransduktion maßgebliche Defizite in der Mechanoadaptation. Um die Ursachen für die differenzielle Mechanoadaptation zu identifizieren, wurde die Rolle von Signalkaskaden mit anaboler, kataboler und nicht eindeutig zugeordneter Wirkung untersucht. Der anabole BMP-Signalweg war kein limitierender Faktor für die Matrixsyntheseleistung der Zellen. Erstmals wurden eine

Mechanoinduktion von PGE_2 für humanes MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe sowie eine signifikant höhere PGE_2 -Freisetzung aus MSC- vs. AC-basiertem Knorpelersatzgewebe unter gleichen Kulturbedingungen belegt. Eine für MSC-basierte Chondrozyten bereits bekannte Freisetzung von NO nach zyklischer Kompression wurde in dieser Studie erstmalig auch für humane AC nachgewiesen. Nachweislich katabole Einflüsse von NF κ B trugen zur gestörten Matrixsynthese in MSC-basierten Chondrozyten nach Belastung bei. Erstmals wurde auch eine *PTH LH*-Stimulation in AC und MSC-basierten Chondrozyten nach dynamischer Kompression belegt. Katabole Einflüsse des PTHrP/cAMP/PKA-Signalwegs deuteten einen Beitrag zur reduzierten Matrixsynthese nach Belastung sowie zur Mechanoinduktion einzelner mechanosensitiver Gene an. Die Belastung stoppte die Differenzierung MSC-basierter Chondrozyten und reduzierte begleitend dazu die Hypertrophie. So hatte die Belastung zwar keinen spezifischen anti-hypertrophen Effekt, eine spezifische *PTH LH*-Stimulation legte allerdings, gemeinsam mit einer Reduktion der Matrixsynthese durch PTHrP(1-34), nahe, dass der anti-chondrogene Effekt der Belastung auch einen Beitrag aus dem PTHrP-Signalweg enthalten könnte.

Diese Studie liefert damit neben der Erweiterung von aus AC bekannten Mechanoadaptierungsparametern um vier Signalkaskaden mit kataboler oder variabler Wirkung auf den Zellmetabolismus (NF κ B, NO, PGE_2 und PTHrP) einen bedeutenden Beitrag zur Charakterisierung der Mechanokompetenz von AC- und MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe. Durch Inhibition kataboler Einflüsse von NF κ B und dem PTHrP/cAMP/PKA-Signalweg wurden wichtige Stellschrauben für die Installation einer Mechanoresistenz von MSC-basierten Chondrozyten hin zu Verhältnissen wie in nativen AC erkannt. Diese Erkenntnisse können nun dazu beitragen, funktionelle Tissue Engineering Ansätze zu verbessern und erweiterte pharmakologische Behandlungsoptionen nach zellbasierten Knorpeltherapieverfahren zu erwägen. Für zukünftige Studien gilt es, den Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die Mechanokompetenz von Knorpelersatzgewebe zu untersuchen und die molekularen Ursachen der variablen SOX9-Regulation durch Belastung in MSC-basierten Chondrozyten zu entschlüsseln.

7 Literaturverzeichnis

- Abramson, S. B. (2008). **Osteoarthritis and nitric oxide**. *Osteoarthritis Cartilage* 16 Suppl 2, S15-20, doi: 10.1016/S1063-4584(08)60008-4.
- Acevedo Rua, L., Mumme, M., Manferdini, C., Darwiche, S., Khalil, A., Hilpert, M., Buchner, D. A., Lisignoli, G., Occhetta, P., von Rechenberg, B., Haug, M., Schaefer, D. J., Jakob, M., Caplan, A., Martin, I., Barbero, A. und Pelttari, K. (2021). **Engineered nasal cartilage for the repair of osteoarthritic knee cartilage defects**. *Sci Transl Med* 13 (609), eaaz4499, doi: 10.1126/scitranslmed.aaz4499.
- Acharya, C., Yik, J. H., Kishore, A., Van Dinh, V., Di Cesare, P. E. und Haudenschild, D. R. (2014). **Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis**. *Matrix Biol* 37, 102-111, doi: 10.1016/j.matbio.2014.06.001.
- Ackerman, W. E. t., Summerfield, T. L., Vandre, D. D., Robinson, J. M. und Kniss, D. A. (2008). **Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells**. *Biol Reprod* 78 (1), 68-76, doi: 10.1095/biolreprod.107.061663.
- Agarwal, S., Deschner, J., Long, P., Verma, A., Hofman, C., Evans, C. H. und Piesco, N. (2004). **Role of NF-kappaB transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals**. *Arthritis Rheum* 50 (11), 3541-3548, doi: 10.1002/art.20601.
- Aisenbrey, E. A. und Bryant, S. J. (2016). **Mechanical loading inhibits hypertrophy in chondrogenically differentiating hMSCs within a biomimetic hydrogel**. *J Mater Chem B* 4 (20), 3562-3574, doi: 10.1039/c6tb00006a.
- Aisenbrey, E. A. und Bryant, S. J. (2019). **The role of chondroitin sulfate in regulating hypertrophy during MSC chondrogenesis in a cartilage mimetic hydrogel under dynamic loading**. *Biomaterials* 190-191, 51-62, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.028.
- Akanji, O. O., Sakthithasan, P., Salter, D. M. und Chowdhury, T. T. (2010). **Dynamic compression alters NFkappaB activation and IkappaB-alpha expression in IL-1beta-stimulated chondrocyte/agarose constructs**. *Inflamm Res* 59 (1), 41-52, doi: 10.1007/s00011-009-0068-9.
- Albarran-Juarez, J., Iring, A., Wang, S., Joseph, S., Grimm, M., Strilic, B., Wettschureck, N., Althoff, T. F. und Offermanns, S. (2018). **Piezo1 and Gq/G11 promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation**. *J Exp Med* 215 (10), 2655-2672, doi: 10.1084/jem.20180483.
- Albro, M. B., Cigan, A. D., Nims, R. J., Yeroushalmi, K. J., Oungouljian, S. R., Hung, C. T. und Ateshian, G. A. (2012). **Shearing of synovial fluid activates latent TGF-beta**. *Osteoarthritis Cartilage* 20 (11), 1374-1382, doi: 10.1016/j.joca.2012.07.006.
- Albro, M. B., Nims, R. J., Cigan, A. D., Yeroushalmi, K. J., Alliston, T., Hung, C. T. und Ateshian, G. A. (2013). **Accumulation of exogenous activated TGF-beta in the superficial zone of articular cartilage**. *Biophys J* 104 (8), 1794-1804, doi: 10.1016/j.bpj.2013.02.052.
- Anderson, D. E. und Johnstone, B. (2017). **Dynamic Mechanical Compression of Chondrocytes for Tissue Engineering: A Critical Review**. *Front Bioeng Biotechnol* 5, 76, doi: 10.3389/fbioe.2017.00076.
- Anghelina, M., Sjoström, D., Perera, P., Nam, J., Knobloch, T. und Agarwal, S. (2008). **Regulation of biomechanical signals by NF-kappaB transcription factors in chondrocytes**. *Biorheology* 45 (3-4), 245-256.
- Armstrong, C. G., Bahrani, A. S. und Gardner, D. L. (1979). **In vitro measurement of articular cartilage deformations in the intact human hip joint under load**. *J Bone Joint Surg Am* 61 (5), 744-755.

- Arnold, M. A., Kim, Y., Czubryt, M. P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. und Olson, E. N. (2007). **MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development.** *Dev Cell* 12 (3), 377-389, doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.004.
- Attur, M., Al-Mussawir, H. E., Patel, J., Kitay, A., Dave, M., Palmer, G., Pillinger, M. H. und Abramson, S. B. (2008). **Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor.** *J Immunol* 181 (7), 5082-5088, doi: 10.4049/jimmunol.181.7.5082.
- Ballock, R. T. und Reddi, A. H. (1994). **Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium.** *J Cell Biol* 126 (5), 1311-1318, doi: 10.1083/jcb.126.5.1311.
- Bandoh, S., Tsukada, T., Maruyama, K., Ohkura, N. und Yamaguchi, K. (1997). **Mechanical agitation induces gene expression of NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines.** *Leukemia* 11 (9), 1453-1458, doi: 10.1038/sj.leu.2400800.
- Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B. und Murphy, J. M. (2001). **Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components.** *Exp Cell Res* 268 (2), 189-200, doi: 10.1006/excr.2001.5278.
- Bartel, D. P. (2004). **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 116 (2), 281-297, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Bassleer, C. T., Combal, J. P., Bougaret, S. und Malaise, M. (1998). **Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 beta on human articular chondrocytes cultivated in clusters.** *Osteoarthritis Cartilage* 6 (3), 196-204, doi: 10.1053/joca.1998.0112.
- Behrendt, P., Ladner, Y., Stoddart, M. J., Lippross, S., Alini, M., Eglin, D. und Armiento, A. R. (2020). **Articular Joint-Simulating Mechanical Load Activates Endogenous TGF-beta in a Highly Cellularized Bioadhesive Hydrogel for Cartilage Repair.** *Am J Sports Med* 48 (1), 210-221, doi: 10.1177/0363546519887909.
- Bentley, G., Biant, L. C., Carrington, R. W., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A. M., Skinner, J. A. und Pringle, J. (2003). **A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee.** *J Bone Joint Surg Br* 85 (2), 223-230, doi: 10.1302/0301-620x.85b2.13543.
- Benya, P. D. und Shaffer, J. D. (1982). **Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.** *Cell* 30 (1), 215-224, doi: 10.1016/0092-8674(82)90027-7.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J. und Yarmush, M. L. (2011). **Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges.** *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2, 403-430, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. und de Crombrughe, B. (1999). **Sox9 is required for cartilage formation.** *Nat Genet* 22 (1), 85-89, doi: 10.1038/8792.
- Bian, L., Zhai, D. Y., Zhang, E. C., Mauck, R. L. und Burdick, J. A. (2012). **Dynamic compressive loading enhances cartilage matrix synthesis and distribution and suppresses hypertrophy in hMSC-laden hyaluronic acid hydrogels.** *Tissue Eng Part A* 18 (7-8), 715-724, doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0455.
- Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R. und Quarto, R. (2003). **Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2.** *Exp Cell Res* 287 (1), 98-105, doi: 10.1016/s0014-4827(03)00138-1.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J. und Wang, C. Y. (2013). **The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine.** *Nat Med* 19 (1), 35-42, doi: 10.1038/nm.3028.

- Bianco, P., Robey, P. G. und Simmons, P. J. (2008). **Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays**. *Cell Stem Cell* 2 (4), 313-319, doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002.
- Biddulph, D. M., Capehart, A. A. und Beasley, T. C. (1991). **Comparative effects of cytosine arabinoside and a prostaglandin E2 antagonist, AH6809, on chondrogenesis in serum-free cultures of chick limb mesenchyme**. *Exp Cell Res* 196 (1), 131-133, doi: 10.1016/0014-4827(91)90465-7.
- Biddulph, D. M., Dozier, M. M. und Capehart, A. A. (2000). **Inhibition of prostaglandin synthesis reduces cyclic AMP levels and inhibits chondrogenesis in cultured chick limb mesenchyme**. *Methods Cell Sci* 22 (1), 9-16, doi: 10.1023/a:1009824106368.
- Blaney Davidson, E. N., Remst, D. F., Vitters, E. L., van Beuningen, H. M., Blom, A. B., Goumans, M. J., van den Berg, W. B. und van der Kraan, P. M. (2009). **Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice**. *J Immunol* 182 (12), 7937-7945, doi: 10.4049/jimmunol.0803991.
- Blaney Davidson, E. N., Vitters, E. L., van Lent, P. L., van de Loo, F. A., van den Berg, W. B. und van der Kraan, P. M. (2007). **Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling**. *Arthritis Res Ther* 9 (5), R102, doi: 10.1186/ar2305.
- Bougault, C., Aubert-Foucher, E., Paumier, A., Perrier-Groult, E., Huot, L., Hot, D., Duterque-Coquillaud, M. und Mallein-Gerin, F. (2012). **Dynamic compression of chondrocyte-agarose constructs reveals new candidate mechanosensitive genes**. *PLoS One* 7 (5), e36964, doi: 10.1371/journal.pone.0036964.
- Bougault, C., Paumier, A., Aubert-Foucher, E. und Mallein-Gerin, F. (2008). **Molecular analysis of chondrocytes cultured in agarose in response to dynamic compression**. *BMC Biotechnol* 8, 71, doi: 10.1186/1472-6750-8-71.
- Bougault, C., Paumier, A., Aubert-Foucher, E. und Mallein-Gerin, F. (2009). **Investigating conversion of mechanical force into biochemical signaling in three-dimensional chondrocyte cultures**. *Nat Protoc* 4 (6), 928-938, doi: 10.1038/nprot.2009.63.
- Boushell, M. K., Hung, C. T., Hunziker, E. B., Strauss, E. J. und Lu, H. H. (2017). **Current strategies for integrative cartilage repair**. *Connect Tissue Res* 58 (5), 393-406, doi: 10.1080/03008207.2016.1231180.
- Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D. und Schwartz, Z. (1996). **Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response**. *Biomaterials* 17 (2), 137-146, doi: 10.1016/0142-9612(96)85758-9.
- Briggs, M. D. und Chapman, K. L. (2002). **Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations**. *Hum Mutat* 19 (5), 465-478, doi: 10.1002/humu.10066.
- Browe, D. C., Coleman, C. M., Barry, F. P. und Elliman, S. J. (2019). **Hypoxia Activates the PTHrP - MEF2C Pathway to Attenuate Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Derived Cartilage**. *Sci Rep* 9 (1), 13274, doi: 10.1038/s41598-019-49499-x.
- Buchert, J., Diederichs, S., Kreuser, U., Merle, C. und Richter, W. (2019). **The Role of Extracellular Matrix Expression, ERK1/2 Signaling and Cell Cohesiveness for Cartilage Yield from iPSCs**. *Int J Mol Sci* 20 (17), doi: 10.3390/ijms20174295.
- Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H. W., Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P. und Grässel, S. (2005). **Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX**. *Mol Cell Biol* 25 (23), 10465-10478, doi: 10.1128/mcb.25.23.10465-10478.2005.
- Burtis, W. J. (1992). **Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement**. *Clin Chem* 38 (11), 2171-2183.

- Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J. und Hunziker, E. B. (1995). **Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture.** *J Cell Sci* 108 (Pt 4), 1497-1508, doi: 10.1242/jcs.108.4.1497.
- Campbell, J. J., Lee, D. A. und Bader, D. L. (2006). **Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells.** *Biorheology* 43 (3,4), 455-470.
- Camper, L., Hellman, U. und Lundgren-Akerlund, E. (1998). **Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes.** *J Biol Chem* 273 (32), 20383-20389, doi: 10.1074/jbc.273.32.20383.
- Cancedda, R., Castagnola, P., Cancedda, F. D., Dozin, B. und Quarto, R. (2000). **Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis.** *Int J Dev Biol* 44 (6), 707-714.
- Capehart, A. A. und Biddulph, D. M. (1991). **Effects of a putative prostaglandin E2 antagonist, AH6809, on chondrogenesis in serum-free cultures of chick limb mesenchyme.** *J Cell Physiol* 147 (3), 403-411, doi: 10.1002/jcp.1041470304.
- Caplan, A. I. (1991). **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 9 (5), 641-650, doi: 10.1002/jor.1100090504.
- Caplan, A. I. (1994). **The mesengenic process.** *Clin Plast Surg* 21 (3), 429-435.
- Caplan, A. I. und Bruder, S. P. (2001). **Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.** *Trends Mol Med* 7 (6), 259-264, doi: 10.1016/s1471-4914(01)02016-0.
- Carlson, A. K., McCutchen, C. N. und June, R. K. (2017). **Mechanobiological implications of articular cartilage crystals.** *Curr Opin Rheumatol* 29 (2), 157-162, doi: 10.1097/BOR.0000000000000368.
- Caulfield, M. P., McKee, R. L., Goldman, M. E., Duong, L. T., Fisher, J. E., Gay, C. T., DeHaven, P. A., Levy, J. J., Roubini, E., Nutt, R. F. und et al. (1990). **The bovine renal parathyroid hormone (PTH) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: the receptor binding domains of PTH and PTH-related protein are located within the 14-34 region.** *Endocrinology* 127 (1), 83-87, doi: 10.1210/endo-127-1-83.
- Cawston, T. E. und Wilson, A. J. (2006). **Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (5), 983-1002, doi: 10.1016/j.berh.2006.06.007.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. und Guegler, K. J. (2005). **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 33 (20), e179, doi: 10.1093/nar/gni178.
- Chen, F. H., Herndon, M. E., Patel, N., Hecht, J. T., Tuan, R. S. und Lawler, J. (2007). **Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan.** *J Biol Chem* 282 (34), 24591-24598, doi: 10.1074/jbc.M611390200.
- Choi, M. C., Jo, J., Park, J., Kang, H. K. und Park, Y. (2019). **NF-kappaB Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction.** *Cells* 8 (7), doi: 10.3390/cells8070734.
- Chu, F., Feng, Q., Hu, Z. und Shen, G. (2017). **Appropriate cyclic tensile strain promotes biological changes of cranial base synchondrosis chondrocytes.** *Orthod Craniofac Res* 20 (3), 177-182, doi: 10.1111/ocr.12194.
- Cochis, A., Grad, S., Stoddart, M. J., Fare, S., Altomare, L., Azzimonti, B., Alini, M. und Rimondini, L. (2017). **Bioreactor mechanically guided 3D mesenchymal stem cell chondrogenesis**

- using a biocompatible novel thermo-reversible methylcellulose-based hydrogel.** *Sci Rep* 7, 45018, doi: 10.1038/srep45018.
- Copray, J. C., Jansen, H. W. und Duterloo, H. S. (1985). **Effects of compressive forces on proliferation and matrix synthesis in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro.** *Arch Oral Biol* 30 (4), 299-304, doi: 10.1016/0003-9969(85)90001-9.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. und Nardi, N. B. (2006). **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci* 119 (Pt 11), 2204-2213, doi: 10.1242/jcs.02932.
- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. und Davies, D. R. (1992). **Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily.** *Science* 257 (5068), 369-373, doi: 10.1126/science.1631557.
- Das, P., Schurman, D. J. und Smith, R. L. (1997). **Nitric oxide and G proteins mediate the response of bovine articular chondrocytes to fluid-induced shear.** *J Orthop Res* 15 (1), 87-93, doi: 10.1002/jor.1100150113.
- Delaine-Smith, R. M. und Reilly, G. C. (2011). **The effects of mechanical loading on mesenchymal stem cell differentiation and matrix production.** *Vitam Horm* 87, 417-480, doi: 10.1016/B978-0-12-386015-6.00039-1.
- Delanois, R. E., Mistry, J. B., Gwam, C. U., Mohamed, N. S., Choksi, U. S. und Mont, M. A. (2017). **Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States.** *J Arthroplasty* 32 (9), 2663-2668, doi: 10.1016/j.arth.2017.03.066.
- DeLise, A. M., Fischer, L. und Tuan, R. S. (2000). **Cellular interactions and signaling in cartilage development.** *Osteoarthritis Cartilage* 8 (5), 309-334, doi: 10.1053/joca.1999.0306.
- Demarteau, O., Wendt, D., Braccini, A., Jakob, M., Schafer, D., Heberer, M. und Martin, I. (2003). **Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 310 (2), 580-588, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.099.
- Deschner, J., Hofman, C. R., Piesco, N. P. und Agarwal, S. (2003). **Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6 (3), 289-293, doi: 10.1097/01.mco.0000068964.34812.2b.
- Dexheimer, V., Frank, S. und Richter, W. (2012). **Proliferation as a requirement for in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells.** *Stem Cells Dev* 21 (12), 2160-2169, doi: 10.1089/scd.2011.0670.
- Dexheimer, V., Gabler, J., Bomans, K., Sims, T., Omlor, G. und Richter, W. (2016). **Differential expression of TGF-beta superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling in chondral versus endochondral chondrocyte differentiation.** *Sci Rep* 6, 36655, doi: 10.1038/srep36655.
- Di Battista, J. A., Dore, S., Martel-Pelletier, J. und Pelletier, J. P. (1996). **Prostaglandin E2 stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I.** *Mol Cell Endocrinol* 123 (1), 27-35, doi: 10.1016/0303-7207(96)03887-7.
- Diao, H. J., Fung, H. S., Yeung, P., Lam, K. L., Yan, C. H. und Chan, B. P. (2017). **Dynamic cyclic compression modulates the chondrogenic phenotype in human chondrocytes from late stage osteoarthritis.** *Biochem Biophys Res Commun* 486 (1), 14-21, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.073.
- Dickhut, A., Pelttari, K., Janicki, P., Wagner, W., Eckstein, V., Egermann, M. und Richter, W. (2009). **Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage.** *J Cell Physiol* 219 (1), 219-226, doi: 10.1002/jcp.21673.

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 8 (4), 315-317, doi: 10.1080/14653240600855905.
- Dreher, S. I., Fischer, J., Walker, T., Diederichs, S. und Richter, W. (2020). **Significance of MEF2C and RUNX3 Regulation for Endochondral Differentiation of Human Mesenchymal Progenitor Cells.** *Front Cell Dev Biol* 8, 81, doi: 10.3389/fcell.2020.00081.
- Du, W., Mills, I. und Sumpio, B. E. (1995). **Cyclic strain causes heterogeneous induction of transcription factors, AP-1, CRE binding protein and NF- κ B, in endothelial cells: species and vascular bed diversity.** *J Biomech* 28 (12), 1485-1491, doi: 10.1016/0021-9290(95)00096-8.
- Dunn, W., DuRaine, G. und Reddi, A. H. (2009). **Profiling microRNA expression in bovine articular cartilage and implications for mechanotransduction.** *Arthritis Rheum* 60 (8), 2333-2339, doi: 10.1002/art.24678.
- Eckstein, F., Hudelmaier, M. und Putz, R. (2006). **The effects of exercise on human articular cartilage.** *J Anat* 208 (4), 491-512, doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00546.x.
- Engel, J., Chen, H. T., Prockop, D. J. und Klump, H. (1977). **The triple helix in equilibrium with coil conversion of collagen-like polytripeptides in aqueous and nonaqueous solvents. Comparison of the thermodynamic parameters and the binding of water to (L-Pro-L-Pro-Gly)n and (L-Pro-L-Hyp-Gly)n.** *Biopolymers* 16 (3), 601-622, doi: 10.1002/bip.1977.360160310.
- Erggelet, C. und Vavken, P. (2016). **Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint - A golden standard?** *J Clin Orthop Trauma* 7 (3), 145-152, doi: 10.1016/j.jcot.2016.06.015.
- Eyre, D. R. (1991). **The collagens of articular cartilage.** *Semin Arthritis Rheum* 21 (3 Suppl 2), 2-11, doi: 10.1016/0049-0172(91)90035-x.
- Fahy, N., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2018). **Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering.** *J Orthop Res* 36 (1), 52-63, doi: 10.1002/jor.23670.
- Falcon, J. M., Chirman, D., Veneziale, A., Morman, J., Bolten, K., Kandel, S., Querido, W., Freeman, T. und Pleshko, N. (2021). **DMOG Negatively Impacts Tissue Engineered Cartilage Development.** *Cartilage* 13 (2_suppl), 722S-733S, doi: 10.1177/1947603520967060.
- Fanning, P., Emkey, G., Smith, R., Grodzinsky, A. und Trippel, S. (2001). **Response of cartilage to mechanical loading is correlated with sustained ERK1/2 activation.** *Transactions of the Orthopaedic Research Society* 26, 172.
- Fanning, P. J., Emkey, G., Smith, R. J., Grodzinsky, A. J., Szasz, N. und Trippel, S. B. (2003). **Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage.** *J Biol Chem* 278 (51), 50940-50948, doi: 10.1074/jbc.M305107200.
- Farndale, R., Buttle, D. und Barrett, A. (1986). **Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 883 (2), 173-177, doi: 10.1016/0304-4165(86)90306-5.
- Fava, R., Olsen, N., Keski-Oja, J., Moses, H. und Pincus, T. (1989). **Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions.** *J Exp Med* 169 (1), 291-296, doi: 10.1084/jem.169.1.291.
- Fell, H. B. (1925). **The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl.** *Journal of Morphology* 40 (3), 417-459, doi: 10.1002/jmor.1050400302.

- Fell, H. B. und Canti, R. G. (1935). **Experiments on the development in vitro of the avian knee joint.** Proc Roy Soc London B (166), 316–351.
- Feng, J. Q., Xing, L., Zhang, J. H., Zhao, M., Horn, D., Chan, J., Boyce, B. F., Harris, S. E., Mundy, G. R. und Chen, D. (2003). **NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line in vitro.** J Biol Chem 278 (31), 29130-29135, doi: 10.1074/jbc.M212296200.
- Fermor, B., Weinberg, J. B., Pisetsky, D. S. und Guilak, F. (2005). **The influence of oxygen tension on the induction of nitric oxide and prostaglandin E2 by mechanical stress in articular cartilage.** Osteoarthritis Cartilage 13 (10), 935-941, doi: 10.1016/j.joca.2005.05.001.
- Fermor, B., Weinberg, J. B., Pisetsky, D. S., Misukonis, M. A., Banes, A. J. und Guilak, F. (2001). **The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants.** J Orthop Res 19 (4), 729-737, doi: 10.1016/S0736-0266(00)00049-8.
- Fioravanti, A., Collodel, G., Petraglia, A., Nerucci, F., Moretti, E. und Galeazzi, M. J. I. J. o. M. R. (2010). **Effect of hydrostatic pressure of various magnitudes on osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1 β .** Indian J Med Res 132 (2), 209.
- Fischer, J., Aulmann, A., Dexheimer, V., Grossner, T. und Richter, W. (2014). **Intermittent PTHrP(1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells.** Stem Cells Dev 23 (20), 2513-2523, doi: 10.1089/scd.2014.0101.
- Fischer, J., Knoch, N., Sims, T., Rosshirt, N. und Richter, W. (2018). **Time-dependent contribution of BMP, FGF, IGF, and HH signaling to the proliferation of mesenchymal stroma cells during chondrogenesis.** J Cell Physiol 233 (11), 8962-8970, doi: 10.1002/jcp.26832.
- Fischer, J., Ortel, M., Hagmann, S., Hoeflich, A. und Richter, W. (2016). **Role of PTHrP(1-34) Pulse Frequency Versus Pulse Duration to Enhance Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis.** J Cell Physiol 231 (12), 2673-2681, doi: 10.1002/jcp.25369.
- Fitzgerald, J. B., Jin, M., Chai, D. H., Siparsky, P., Fanning, P. und Grodzinsky, A. J. (2008). **Shear- and compression-induced chondrocyte transcription requires MAPK activation in cartilage explants.** J Biol Chem 283 (11), 6735-6743, doi: 10.1074/jbc.M708670200.
- Fitzgerald, J. B., Jin, M., Dean, D., Wood, D. J., Zheng, M. H. und Grodzinsky, A. J. (2004). **Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP.** J Biol Chem 279 (19), 19502-19511, doi: 10.1074/jbc.M400437200.
- Fitzgerald, J. B., Jin, M. und Grodzinsky, A. J. (2006). **Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue.** J Biol Chem 281 (34), 24095-24103, doi: 10.1074/jbc.M510858200.
- Foley, S., Ding, C., Cicuttini, F. und Jones, G. (2007). **Physical activity and knee structural change: a longitudinal study using MRI.** Med Sci Sports Exerc 39 (3), 426-434, doi: 10.1249/mss.0b013e31802d97c6.
- Fransen, M., McConnell, S., Harmer, A. R., Van der Esch, M., Simic, M. und Bennell, K. L. (2015). **Exercise for osteoarthritis of the knee.** Cochrane Database Syst Rev 1, CD004376, doi: 10.1002/14651858.CD004376.pub3.
- Fukui, N., Ikeda, Y., Ohnuki, T., Hikita, A., Tanaka, S., Yamane, S., Suzuki, R., Sandell, L. J. und Ochi, T. (2006). **Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation.** J Biol Chem 281 (37), 27229-27241, doi: 10.1074/jbc.M603385200.
- Galotto, M., Campanile, G., Robino, G., Cancedda, F. D., Bianco, P. und Cancedda, R. (1994). **Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo.** J Bone Miner Res 9 (8), 1239-1249, doi: 10.1002/jbmr.5650090814.

- Gardner, O. F., Fahy, N., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2016). **Differences in human mesenchymal stem cell secretomes during chondrogenic induction.** *Eur Cell Mater* 31, 221-235, doi: 10.22203/ecm.v031a15.
- Gardner, O. F. W., Musumeci, G., Neumann, A. J., Eglin, D., Archer, C. W., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2017). **Asymmetrical seeding of MSCs into fibrin-poly(ester-urethane) scaffolds and its effect on mechanically induced chondrogenesis.** *J Tissue Eng Regen Med* 11 (10), 2912-2921, doi: 10.1002/term.2194.
- Gay, S. W. und Kosher, R. A. (1984). **Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor cells of the chick limb bud: effect of prostaglandins.** *J Exp Zool* 232 (2), 317-326, doi: 10.1002/jez.1402320219.
- Giannoni, P., Crovace, A., Malpeli, M., Maggi, E., Arbico, R., Cancedda, R. und Dozin, B. (2005). **Species variability in the differentiation potential of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models.** *Tissue Eng* 11 (1-2), 237-248, doi: 10.1089/ten.2005.11.237.
- Gilbert, S. J. und Blain, E. J. (2018). **Cartilage mechanobiology: how chondrocytes respond to mechanical load.** In: *Mechanobiology in Health and Disease*, Elsevier, S. 99-126.
- Gosset, M., Berenbaum, F., Levy, A., Pigenet, A., Thirion, S., Saffar, J. L. und Jacques, C. (2006). **Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene.** *Arthritis Res Ther* 8 (4), R135, doi: 10.1186/ar2024.
- Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D'Souza, M., Puzas, J. E., Reynolds, P. R., Rosier, R. N. und O'Keefe, R. J. (1999). **BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation.** *J Bone Miner Res* 14 (4), 475-482, doi: 10.1359/jbmr.1999.14.4.475.
- Grodzinsky, A. J., Levenston, M. E., Jin, M. und Frank, E. H. (2000). **Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces.** *Annu Rev Biomed Eng* 2, 691-713, doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.691.
- Grogan, S. P., Sovani, S., Pauli, C., Chen, J., Hartmann, A., Colwell, C. W., Jr., Lotz, M. K. und D'Lima, D. D. (2012). **Effects of perfusion and dynamic loading on human neocartilage formation in alginate hydrogels.** *Tissue Eng Part A* 18 (17-18), 1784-1792, doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0506.
- Guan, Y. J., Yang, X., Wei, L. und Chen, Q. (2011). **MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4.** *FASEB J* 25 (12), 4457-4466, doi: 10.1096/fj.11-185132.
- Guellaen, G., Mahu, J. L., Mavier, P., Berthelot, P. und Hanoune, J. (1977). **RMI 12330 A, an inhibitor of adenylate cyclase in rat liver.** *Biochim Biophys Acta* 484 (2), 465-475, doi: 10.1016/0005-2744(77)90102-4.
- Gugjoo, M. B., Amarpal, Sharma, G. T., Aithal, H. P. und Kinjavdekar, P. (2016). **Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds.** *Indian J Med Res* 144 (3), 339-347, doi: 10.4103/0971-5916.198724.
- Guilak, F. (2011). **Biomechanical factors in osteoarthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25 (6), 815-823, doi: 10.1016/j.berh.2011.11.013.
- Guilak, F., Butler, D. L. und Goldstein, S. A. (2001). **Functional tissue engineering: the role of biomechanics in articular cartilage repair.** *Clin Orthop Relat Res* (391 Suppl), S295-305.
- Guilak, F., Fermor, B., Keefe, F. J., Kraus, V. B., Olson, S. A., Pisetsky, D. S., Setton, L. A. und Weinberg, J. B. (2004). **The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair.** *Clin Orthop Relat Res* (423), 17-26, doi: 10.1097/01.blo.0000131233.83640.91.
- Guo, T., Yu, L., Lim, C. G., Goodley, A. S., Xiao, X., Placone, J. K., Ferlin, K. M., Nguyen, B. N., Hsieh, A. H. und Fisher, J. P. (2016). **Effect of Dynamic Culture and Periodic Compression on**

- Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenesis.** *Ann Biomed Eng* 44 (7), 2103-2113, doi: 10.1007/s10439-015-1510-5.
- Hale, J. E., Fraser, J. D. und Price, P. A. (1988). **The identification of matrix Gla protein in cartilage.** *J Biol Chem* 263 (12), 5820-5824.
- Han, X., Guo, L., Wang, F., Zhu, Q. und Yang, L. (2014). **Contribution of PTHrP to mechanical strain-induced fibrochondrogenic differentiation in entheses of Achilles tendon of miniature pigs.** *J Biomech* 47 (10), 2406-2414, doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.04.022.
- Hardy, M. M., Seibert, K., Manning, P. T., Currie, M. G., Woerner, B. M., Edwards, D., Koki, A. und Tripp, C. S. (2002). **Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants.** *Arthritis Rheum* 46 (7), 1789-1803, doi: 10.1002/art.10356.
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A. und Volarevic, V. (2019). **Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives.** *Biomed Pharmacother* 109, 2318-2326, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.099.
- Haudenschild, D. R., Hong, E., Yik, J. H., Chromy, B., Morgelin, M., Snow, K. D., Acharya, C., Takada, Y. und Di Cesare, P. E. (2011). **Enhanced activity of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) bound to cartilage oligomeric matrix protein.** *J Biol Chem* 286 (50), 43250-43258, doi: 10.1074/jbc.M111.234716.
- Hauselmann, H. J., Oppliger, L., Michel, B. A., Stefanovic-Racic, M. und Evans, C. H. (1994). **Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture.** *FEBS Lett* 352 (3), 361-364, doi: 10.1016/0014-5793(94)00994-5.
- Haversath, M., Catelas, I., Li, X., Tassemeier, T. und Jager, M. (2012). **PGE(2) and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways.** *Can J Physiol Pharmacol* 90 (11), 1434-1445, doi: 10.1139/y2012-123.
- Healy, C., Uwanogho, D. und Sharpe, P. T. (1999). **Regulation and role of Sox9 in cartilage formation.** *Dev Dyn* 215 (1), 69-78, doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199905)215:1<69::AID-DVDY8>3.0.CO;2-N.
- Hecht, N. (2020). **Differenzielle Regulation von mechanosensitiven microRNAs nach anaboler und kataboler mechanischer Belastung von humanem Knorpelersatzgewebe.**
- Hecht, N., Johnstone, B., Angele, P., Walker, T. und Richter, W. (2019). **Mechanosensitive MiRs regulated by anabolic and catabolic loading of human cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 27 (8), 1208-1218, doi: 10.1016/j.joca.2019.04.010.
- Heidemann, C., Scheidt-Nave, C., Beyer, A. K., Baumert, J., Thamm, R., Maier, B., Neuhauser, H., Fuchs, J., Kuhnert, R. und Hapke, U. (2021). **Health situation of adults in Germany - Results for selected indicators from GEDA 2019/2020-EHIS.** *J Health Monit* 6 (3), 3-25, doi: 10.25646/8459.
- Hellingman, C. A., Davidson, E. N., Koevoet, W., Vitters, E. L., van den Berg, W. B., van Osch, G. J. und van der Kraan, P. M. (2011). **Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification.** *Tissue Eng Part A* 17 (7-8), 1157-1167, doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0043.
- Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F. und Richter, W. (2007). **Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6.** *J Cell Physiol* 211 (3), 682-691, doi: 10.1002/jcp.20977.
- Herberhold, C., Faber, S., Stammberger, T., Steinlechner, M., Putz, R., Englmeier, K. H., Reiser, M. und Eckstein, F. (1999). **In situ measurement of articular cartilage deformation in intact femoropatellar joints under static loading.** *J Biomech* 32 (12), 1287-1295, doi: 10.1016/s0021-9290(99)00130-x.

- Hishikawa, K., Oemar, B. S., Yang, Z. und Luscher, T. F. (1997). **Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle.** *Circ Res* 81 (5), 797-803, doi: 10.1161/01.res.81.5.797.
- Ho, P. W. M., Chan, A. S., Pavlos, N. J., Sims, N. A. und Martin, T. J. (2019). **Brief exposure to full length parathyroid hormone-related protein (PTHrP) causes persistent generation of cyclic AMP through an endocytosis-dependent mechanism.** *Biochem Pharmacol* 169, 113627, doi: 10.1016/j.bcp.2019.113627.
- Hofer, A. M. (2012). **Interactions between calcium and cAMP signaling.** *Curr Med Chem* 19 (34), 5768-5773, doi: 10.2174/092986712804143286.
- Huang, C. Y., Reuben, P. M. und Cheung, H. S. (2005). **Temporal expression patterns and corresponding protein inductions of early responsive genes in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells under cyclic compressive loading.** *Stem Cells* 23 (8), 1113-1121, doi: 10.1634/stemcells.2004-0202.
- Huang, L., Cai, X., Li, H., Xie, Q., Zhang, M. und Yang, C. (2015). **The effects of static pressure on chondrogenic and osteogenic differentiation in condylar chondrocytes from temporomandibular joint.** *Arch Oral Biol* 60 (4), 622-630, doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.01.003.
- Hung, C. T., Henshaw, D. R., Wang, C. C., Mauck, R. L., Raia, F., Palmer, G., Chao, P. H., Mow, V. C., Ratcliffe, A. und Valhmu, W. B. (2000). **Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization.** *J Biomech* 33 (1), 73-80, doi: 10.1016/s0021-9290(99)00176-1.
- Hunter, D. J. und Bierma-Zeinstra, S. (2019). **Osteoarthritis.** *Lancet* 393 (10182), 1745-1759, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- Hunter, W. (1743). **VI. Of the structure and diseases of articulating cartilages.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 42 (470), 514-521, doi: 10.1098/rstl.1742.0079.
- Ingber, D. (1991). **Integrins as mechanochemical transducers.** *Curr Opin Cell Biol* 3 (5), 841-848, doi: 10.1016/0955-0674(91)90058-7.
- Iqbal, J. und Zaidi, M. (2005). **Molecular regulation of mechanotransduction.** *Biochem Biophys Res Commun* 328 (3), 751-755, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.087.
- Ishida, K., Acharya, C., Christiansen, B. A., Yik, J. H., DiCesare, P. E. und Haudenschild, D. R. (2013). **Cartilage oligomeric matrix protein enhances osteogenesis by directly binding and activating bone morphogenetic protein-2.** *Bone* 55 (1), 23-35, doi: 10.1016/j.bone.2013.03.007.
- Jahangir, S., Eglin, D., Potter, N., Khozaei Ravari, M., Stoddart, M. J., Samadikuchaksaraei, A., Alini, M., Baghaban Eslaminejad, M. und Safa, M. (2020). **Inhibition of hypertrophy and improving chondrocyte differentiation by MMP-13 inhibitor small molecule encapsulated in alginate-chondroitin sulfate-platelet lysate hydrogel.** *Stem Cell Res Ther* 11 (1), 436, doi: 10.1186/s13287-020-01930-1.
- Jalali, S., Li, Y. S., Sotoudeh, M., Yuan, S., Li, S., Chien, S. und Shyy, J. Y. (1998). **Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (2), 227-234, doi: 10.1161/01.atv.18.2.227.
- Jang, S., Lee, K. und Ju, J. H. (2021). **Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee.** *Int J Mol Sci* 22 (5), doi: 10.3390/ijms22052619.
- Jeon, J. E., Schrobback, K., Hutmacher, D. W. und Klein, T. J. (2012). **Dynamic compression improves biosynthesis of human zonal chondrocytes from osteoarthritis patients.** *Osteoarthritis Cartilage* 20 (8), 906-915, doi: 10.1016/j.joca.2012.04.019.

- Jeon, J. E., Schrobback, K., Meinert, C., Sramek, V., Hutmacher, D. W. und Klein, T. J. (2013). **Effect of preculture and loading on expression of matrix molecules, matrix metalloproteinases, and cytokines by expanded osteoarthritic chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 65 (9), 2356-2367, doi: 10.1002/art.38049.
- Johnson, G. P., Fair, S. und Hoey, D. A. (2021). **Primary cilium-mediated MSC mechanotransduction is dependent on Gpr161 regulation of hedgehog signalling.** *Bone* 145, 115846, doi: 10.1016/j.bone.2021.115846.
- Johnson, G. P., Stavenschi, E., Eichholz, K. F., Corrigan, M. A., Fair, S. und Hoey, D. A. (2018). **Mesenchymal stem cell mechanotransduction is cAMP dependent and regulated by adenylyl cyclase 6 and the primary cilium.** *J Cell Sci* 131 (21), doi: 10.1242/jcs.222737.
- Johnstone, B., Alini, M., Cucchiari, M., Dodge, G. R., Eglin, D., Guilak, F., Madry, H., Mata, A., Mauck, R. L., Semino, C. E. und Stoddart, M. J. (2013). **Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art.** *Eur Cell Mater* 25, 248-267, doi: 10.22203/ecm.v025a18.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. und Yoo, J. U. (1998). **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** *Exp Cell Res* 238 (1), 265-272, doi: 10.1006/excr.1997.3858.
- Joldersma, M., Burger, E. H., Semeins, C. M. und Klein-Nulend, J. (2000). **Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women.** *J Biomech* 33 (1), 53-61, doi: 10.1016/s0021-9290(99)00172-4.
- Jorgensen, A. E. M., Kjaer, M. und Heinemeier, K. M. (2017). **The Effect of Aging and Mechanical Loading on the Metabolism of Articular Cartilage.** *J Rheumatol* 44 (4), 410-417, doi: 10.3899/jrheum.160226.
- Juhasz, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, E., Takacs, R., Soha, R. F., Szabo, I. A., Cserhati, C., Szody, R., Karacsonyi, Z., Bako, E., Gergely, P. und Zakany, R. (2014). **Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures.** *Cell Signal* 26 (3), 468-482, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.12.001.
- Kaltschmidt, B., Linker, R. A., Deng, J. und Kaltschmidt, C. (2002). **Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB.** *BMC Mol Biol* 3, 16, doi: 10.1186/1471-2199-3-16.
- Kamakura, S., Sasano, Y., Shimizu, T., Hatori, K., Suzuki, O., Kagayama, M. und Motegi, K. (2002). **Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite.** *J Biomed Mater Res* 59 (1), 29-34, doi: 10.1002/jbm.1213.
- Khan, I. M., Gilbert, S. J., Singhrao, S. K., Duance, V. C. und Archer, C. W. (2008). **Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review.** *Eur Cell Mater* 16 (16), 26-39, doi: 10.22203/ecm.v016a04.
- Kim, Y. J., Sah, R. L., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H. und Sandy, J. D. (1994). **Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli.** *Arch Biochem Biophys* 311 (1), 1-12, doi: 10.1006/abbi.1994.1201.
- Kiviranta, I., Jurvelin, J., Tammi, M., Saamanen, A. M. und Helminen, H. J. (1987). **Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs.** *Arthritis Rheum* 30 (7), 801-809, doi: 10.1002/art.1780300710.
- Kleemann, R. U., Schell, H., Thompson, M., Epari, D. R., Duda, G. N. und Weiler, A. (2007). **Mechanical behavior of articular cartilage after osteochondral autograft transfer in an ovine model.** *Am J Sports Med* 35 (4), 555-563, doi: 10.1177/0363546506296311.
- Klein-Nulend, J., Burger, E. H., Semeins, C. M., Raisz, L. G. und Pilbeam, C. C. (1997). **Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells.** *J Bone Miner Res* 12 (1), 45-51, doi: 10.1359/jbmr.1997.12.1.45.

- Knobloch, T. J., Madhavan, S., Nam, J., Agarwal, S., Jr. und Agarwal, S. (2008). **Regulation of chondrocytic gene expression by biomechanical signals**. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18 (2), 139-150, doi: 10.1615/critrevueukargeneexpr.v18.i2.30.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. und Kishimoto, T. (1997). **Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts**. *Cell* 89 (5), 755-764, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80258-5.
- Komuro, I., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Katoh, Y., Hoh, E., Takaku, F. und Yazaki, Y. (1990). **Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression**. *J Biol Chem* 265 (7), 3595-3598.
- Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F. und Yazaki, Y. (1991). **Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation**. *J Biol Chem* 266 (2), 1265-1268.
- Korver, T. H., van de Stadt, R. J., Kiljan, E., van Kampen, G. P. und van der Korst, J. K. (1992). **Effects of loading on the synthesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage in vitro**. *J Rheumatol* 19 (6), 905-912.
- Kosher, R. A., Kulyk, W. M. und Gay, S. W. (1986). **Collagen gene expression during limb cartilage differentiation**. *J Cell Biol* 102 (4), 1151-1156, doi: 10.1083/jcb.102.4.1151.
- Kosher, R. A. und Walker, K. H. (1983). **The effect of prostaglandins on in vitro limb cartilage differentiation**. *Exp Cell Res* 145 (1), 145-153, doi: 10.1016/s0014-4827(83)80016-0.
- Krase, A., Abedian, R., Steck, E., Hurschler, C. und Richter, W. (2014). **BMP activation and Wnt-signalling affect biochemistry and functional biomechanical properties of cartilage tissue engineering constructs**. *Osteoarthritis Cartilage* 22 (2), 284-292, doi: 10.1016/j.joca.2013.11.011.
- Kravis, D. und Upholt, W. B. (1985). **Quantitation of type II procollagen mRNA levels during chick limb cartilage differentiation**. *Dev Biol* 108 (1), 164-172, doi: 10.1016/0012-1606(85)90018-1.
- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M. und Sudkamp, N. (2006). **Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee**. *Osteoarthritis Cartilage* 14 (11), 1119-1125, doi: 10.1016/j.joca.2006.05.003.
- Krishnan, Y. und Grodzinsky, A. J. (2018). **Cartilage diseases**. *Matrix Biol* 71-72, 51-69, doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.005.
- Kronenberg, H. M. (2003). **Developmental regulation of the growth plate**. *Nature* 423 (6937), 332-336, doi: 10.1038/nature01657.
- Kronenberg, H. M. (2006). **PTHrP and skeletal development**. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 1-13, doi: 10.1196/annals.1346.002.
- Kuo, C. K., Li, W. J., Mauck, R. L. und Tuan, R. S. (2006). **Cartilage tissue engineering: its potential and uses**. *Curr Opin Rheumatol* 18 (1), 64-73, doi: 10.1097/01.bor.0000198005.88568.df.
- Lan, Q., Mercurius, K. O. und Davies, P. F. (1994). **Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress**. *Biochem Biophys Res Commun* 201 (2), 950-956, doi: 10.1006/bbrc.1994.1794.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. (1993). **Tissue engineering**. *Science* 260 (5110), 920-926, doi: 10.1126/science.8493529.

- Larsson, T., Aspden, R. M. und Heinegard, D. (1991). **Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis in vitro.** *Matrix* 11 (6), 388-394, doi: 10.1016/s0934-8832(11)80193-9.
- Lee, C. C., Christensen, J. E., Yoder, M. C. und Tarantal, A. F. (2010). **Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells.** *Exp Hematol* 38 (1), 46-54, doi: 10.1016/j.exphem.2009.11.001.
- Lee, D. A. und Bader, D. L. (1997). **Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose.** *J Orthop Res* 15 (2), 181-188, doi: 10.1002/jor.1100150205.
- Lee, J., Rhee, M. H., Kim, E. und Cho, J. Y. (2012). **BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets.** *Mediators Inflamm* 2012, 416036, doi: 10.1155/2012/416036.
- Lee, M. S., Trindade, M. C., Ikenoue, T., Goodman, S. B., Schurman, D. J. und Smith, R. L. (2003). **Regulation of nitric oxide and bcl-2 expression by shear stress in human osteoarthritic chondrocytes in vitro.** *J Cell Biochem* 90 (1), 80-86, doi: 10.1002/jcb.10611.
- Lee, W., Guilak, F. und Liedtke, W. (2017). **Role of Piezo Channels in Joint Health and Injury.** *Curr Top Membr* 79, 263-273, doi: 10.1016/bs.ctm.2016.10.003.
- Lefebvre, V. und Smits, P. (2005). **Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 (3), 200-212, doi: 10.1002/bdrc.20048.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A. und Fassler, R. (2009). **Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling.** *Genes Dev* 23 (4), 397-418, doi: 10.1101/gad.1758709.
- Li, K. W., Wang, A. S. und Sah, R. L. (2003). **Microenvironment regulation of extracellular signal-regulated kinase activity in chondrocytes: effects of culture configuration, interleukin-1, and compressive stress.** *Arthritis Rheum* 48 (3), 689-699, doi: 10.1002/art.10849.
- Li, T. F., Yukata, K., Yin, G., Sheu, T., Maruyama, T., Jonason, J. H., Hsu, W., Zhang, X., Xiao, G., Kontinen, Y. T., Chen, D. und O'Keefe, R. J. (2014). **BMP-2 induces ATF4 phosphorylation in chondrocytes through a COX-2/PGE2 dependent signaling pathway.** *Osteoarthritis Cartilage* 22 (3), 481-489, doi: 10.1016/j.joca.2013.12.020.
- Li, Y., Kim, I. C., Kim, Y. J., Kim, M. K., Yoon, Y. D., Lee, Y. S. und Lee, J. S. (2004). **Cloning and sequence analysis of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* immediate early gene *c-fos*.** *Mar Environ Res* 58 (2-5), 681-685, doi: 10.1016/j.marenvres.2004.03.062.
- Li, Y., Li, M., Tan, L., Huang, S., Zhao, L., Tang, T., Liu, J. und Zhao, Z. (2013). **Analysis of time-course gene expression profiles of a periodontal ligament tissue model under compression.** *Arch Oral Biol* 58 (5), 511-522, doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.006.
- Li, Z., Kupcsik, L., Yao, S. J., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2010). **Mechanical load modulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells through the TGF-beta pathway.** *J Cell Mol Med* 14 (6A), 1338-1346, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00780.x.
- Li, Z., Yao, S.-J., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2009). **Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites is modulated by frequency and amplitude of dynamic compression and shear stress.** *Tissue Engineering Part A* 16 (2), 575-584.
- Litwic, A., Edwards, M. H., Dennison, E. M. und Cooper, C. (2013). **Epidemiology and burden of osteoarthritis.** *Br Med Bull* 105, 185-199, doi: 10.1093/bmb/lds038.
- Lochner, A. und Moolman, J. A. (2006). **The many faces of H89: a review.** *Cardiovasc Drug Rev* 24 (3-4), 261-274, doi: 10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x.
- Loeser, R. F. (2014). **Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage.** *Matrix Biol* 39, 11-16, doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.007.

- Lorenz, H. und Richter, W. (2006). **Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage**. *Prog Histochem Cytochem* 40 (3), 135-163, doi: 10.1016/j.proghi.2006.02.003.
- Lotz, M. (2001). **Cytokines in cartilage injury and repair**. *Clin Orthop Relat Res* 391 (391 Suppl), S108-115, doi: 10.1097/00003086-200110001-00011.
- Lowe, G. N., Fu, Y. H., McDougall, S., Polendo, R., Williams, A., Benya, P. D. und Hahn, T. J. (1996). **Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line: role of second messengers**. *Endocrinology* 137 (6), 2208-2216, doi: 10.1210/endo.137.6.8641167.
- Lucchinetti, E., Bhargava, M. M. und Torzilli, P. A. (2004). **The effect of mechanical load on integrin subunits alpha5 and beta1 in chondrocytes from mature and immature cartilage explants**. *Cell Tissue Res* 315 (3), 385-391, doi: 10.1007/s00441-003-0836-8.
- MackKenna, D. A., Dolfi, F., Vuori, K. und Ruoslahti, E. (1998). **Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts**. *J Clin Invest* 101 (2), 301-310, doi: 10.1172/JCI1026.
- Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. und Tarnopolsky, M. A. (2005). **Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise**. *FASEB J* 19 (11), 1498-1500, doi: 10.1096/fj.04-3149fje.
- Marcu, K. B., Otero, M., Olivotto, E., Borzi, R. M. und Goldring, M. B. (2010). **NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA**. *Curr Drug Targets* 11 (5), 599-613, doi: 10.2174/138945010791011938.
- Mariani, E., Pulsatelli, L. und Facchini, A. (2014). **Signaling pathways in cartilage repair**. *Int J Mol Sci* 15 (5), 8667-8698, doi: 10.3390/ijms15058667.
- Martin, T. J. (2016). **Parathyroid Hormone-Related Protein, Its Regulation of Cartilage and Bone Development, and Role in Treating Bone Diseases**. *Physiol Rev* 96 (3), 831-871, doi: 10.1152/physrev.00031.2015.
- Martin, T. J., Sims, N. A. und Seeman, E. (2021). **Physiological and Pharmacological Roles of PTH and PTHrP in Bone Using Their Shared Receptor, PTH1R**. *Endocr Rev* 42 (4), 383-406, doi: 10.1210/edrev/bnab005.
- McDermott, A. M., Eastburn, E. A., Kelly, D. J. und Boerckel, J. D. (2021). **Effects of chondrogenic priming duration on mechanoregulation of engineered cartilage**. *J Biomech* 125, 110580, doi: 10.1016/j.jbiomech.2021.110580.
- Mellor, L. F., Mohiti-Asli, M., Williams, J., Kannan, A., Dent, M. R., Guilak, F. und Lobo, E. G. (2015). **Extracellular Calcium Modulates Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells: A Novel Approach for Osteochondral Tissue Engineering Using a Single Stem Cell Source**. *Tissue Eng Part A* 21 (17-18), 2323-2333, doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0572.
- Millan, J. L. (2013). **The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization**. *Calcif Tissue Int* 93 (4), 299-306, doi: 10.1007/s00223-012-9672-8.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. und Vortkamp, A. (2001). **BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation**. *Development* 128 (22), 4523-4534, doi: 10.1242/dev.128.22.4523.
- Miyamoto, M., Ito, H., Mukai, S., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Kobayashi, M., Maruyama, T., Akiyama, H. und Nakamura, T. (2003). **Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation**. *Osteoarthritis and Cartilage* 11 (9), 644-652, doi: 10.1016/s1063-4584(03)00118-3.
- Monaco, G., El Haj, A. J., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2021). **Sodium hyaluronate supplemented culture medium combined with joint-simulating mechanical loading improves**

- chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.** *Eur Cell Mater* 41, 616-632, doi: 10.22203/eCM.v041a40.
- Mow, V. C. und Huiskes, R. (2005). **Basic orthopaedic biomechanics & mechano-biology**, Lippincott Williams & Wilkins.
- Mueller, M. B., Fischer, M., Zellner, J., Berner, A., Dienstknecht, T., Kujat, R., Prantl, L., Nerlich, M., Tuan, R. S. und Angele, P. (2013). **Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis.** *Int Orthop* 37 (5), 945-951, doi: 10.1007/s00264-013-1800-1.
- Murakami, S., Lefebvre, V. und de Crombrughe, B. (2000). **Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha.** *J Biol Chem* 275 (5), 3687-3692, doi: 10.1074/jbc.275.5.3687.
- Murray, A. J. (2008). **Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems.** *Sci Signal* 1 (22), re4, doi: 10.1126/scisignal.122re4.
- Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Trovato, F. M., Weinberg, A. M., Al-Wasiyah, M. K., Alqahtani, M. H. und Mobasher, A. (2015). **Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis.** *Int J Mol Sci* 16 (9), 20560-20575, doi: 10.3390/ijms160920560.
- Nagel, T., Resnick, N., Dewey, C. F., Jr. und Gimbrone, M. A., Jr. (1999). **Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (8), 1825-1834, doi: 10.1161/01.atv.19.8.1825.
- Nakagawa, K., Imai, Y., Ohta, Y. und Takaoka, K. (2007). **Prostaglandin E2 EP4 agonist (ONO-4819) accelerates BMP-induced osteoblastic differentiation.** *Bone* 41 (4), 543-548, doi: 10.1016/j.bone.2007.06.013.
- Nam, J., Aguda, B. D., Rath, B. und Agarwal, S. (2009). **Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF-kappaB pathway: experiments and modeling.** *PLoS One* 4 (4), e5262, doi: 10.1371/journal.pone.0005262.
- Nebelung, S., Gavenis, K., Luring, C., Zhou, B., Mueller-Rath, R., Stoffel, M., Tingart, M. und Rath, B. (2012). **Simultaneous anabolic and catabolic responses of human chondrocytes seeded in collagen hydrogels to long-term continuous dynamic compression.** *Ann Anat* 194 (4), 351-358, doi: 10.1016/j.aanat.2011.12.008.
- Nebelung, S., Gavenis, K., Rath, B., Tingart, M., Ladenburger, A., Stoffel, M., Zhou, B. und Mueller-Rath, R. (2011). **Continuous cyclic compressive loading modulates biological and mechanical properties of collagen hydrogels seeded with human chondrocytes.** *Biorheology* 48 (5), 247-261, doi: 10.3233/BIR-2012-0597.
- Nerem, R. M. (1991). **Cellular engineering.** *Ann Biomed Eng* 19 (5), 529-545, doi: 10.1007/BF02367396.
- Newton, R., Kuitert, L. M., Bergmann, M., Adcock, I. M. und Barnes, P. J. (1997). **Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta.** *Biochem Biophys Res Commun* 237 (1), 28-32, doi: 10.1006/bbrc.1997.7064.
- Ng, A. F., Yang, Y. O., Wong, R. W., Hagg, E. U. und Rabie, A. B. (2006). **Factors regulating condylar cartilage growth under repeated load application.** *Front Biosci* 11, 949-954, doi: 10.2741/1851.
- Notzli, H. und Clark, J. (1997). **Deformation of loaded articular cartilage prepared for scanning electron microscopy with rapid freezing and freeze-substitution fixation.** *J Orthop Res* 15 (1), 76-86, doi: 10.1002/jor.1100150112.
- Ogawa, H., Kozhemyakina, E., Hung, H. H., Grodzinsky, A. J. und Lassar, A. B. (2014). **Mechanical motion promotes expression of Prg4 in articular cartilage via multiple CREB-dependent, fluid flow shear stress-induced signaling pathways.** *Genes Dev* 28 (2), 127-139, doi: 10.1101/gad.231969.113.

- Ogihara, Y., Suda, N., Hammond, V. E., Senior, P. V., Beck, F. und Yanagishita, M. (2001). **Biosynthesis of proteoglycan in bone and cartilage of parathyroid hormone-related protein knockout mice.** *J Bone Miner Metab* 19 (1), 4-12, doi: 10.1007/s007740170054.
- Olivares-Navarrete, R., Lee, E. M., Smith, K., Hyzy, S. L., Doroudi, M., Williams, J. K., Gall, K., Boyan, B. D. und Schwartz, Z. (2017). **Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli.** *PLoS One* 12 (1), e0170312, doi: 10.1371/journal.pone.0170312.
- Owen, M. und Friedenstein, A. J. (1988). **Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.** *Ciba Found Symp* 136, 42-60, doi: 10.1002/9780470513637.ch4.
- Palmoski, M. J. und Brandt, K. D. (1981). **Running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast.** *Arthritis Rheum* 24 (11), 1329-1337, doi: 10.1002/art.1780241101.
- Palmoski, M. J. und Brandt, K. D. (1984). **Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro.** *Arthritis Rheum* 27 (6), 675-681, doi: 10.1002/art.1780270611.
- Palmoski, M. J., Colyer, R. A. und Brandt, K. D. (1980). **Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal articular cartilage.** *Arthritis Rheum* 23 (3), 325-334, doi: 10.1002/art.1780230310.
- Palmoski, M. J. und Goetinck, P. F. (1972). **Synthesis of proteochondroitin sulfate by normal, nanomelic, and 5-bromodeoxyuridine-treated chondrocytes in cell culture.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 69 (11), 3385-3388, doi: 10.1073/pnas.69.11.3385.
- Palomares, K. T., Gleason, R. E., Mason, Z. D., Cullinane, D. M., Einhorn, T. A., Gerstenfeld, L. C. und Morgan, E. F. (2009). **Mechanical stimulation alters tissue differentiation and molecular expression during bone healing.** *J Orthop Res* 27 (9), 1123-1132, doi: 10.1002/jor.20863.
- Park, J. Y., Pillinger, M. H. und Abramson, S. B. (2006). **Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases.** *Clin Immunol* 119 (3), 229-240, doi: 10.1016/j.clim.2006.01.016.
- Park, S., Nicoll, S. B., Mauck, R. L. und Ateshian, G. A. (2008). **Cartilage mechanical response under dynamic compression at physiological stress levels following collagenase digestion.** *Ann Biomed Eng* 36 (3), 425-434, doi: 10.1007/s10439-007-9431-6.
- Parkkinen, J. J., Ikonen, J., Lammi, M. J., Laakkonen, J., Tammi, M. und Helminen, H. J. (1993). **Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants.** *Arch Biochem Biophys* 300 (1), 458-465, doi: 10.1006/abbi.1993.1062.
- Parkkinen, J. J., Lammi, M. J., Helminen, H. J. und Tammi, M. (1992). **Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro.** *J Orthop Res* 10 (5), 610-620, doi: 10.1002/jor.1100100503.
- Pearen, M. A. und Muscat, G. E. (2010). **Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease.** *Mol Endocrinol* 24 (10), 1891-1903, doi: 10.1210/me.2010-0015.
- Pelaez, D., Arita, N. und Cheung, H. S. (2012). **Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression.** *Biochem Biophys Res Commun* 417 (4), 1286-1291, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.131.
- Pelaez, D., Huang, C. Y. und Cheung, H. S. (2009). **Cyclic compression maintains viability and induces chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin gel scaffolds.** *Stem Cells Dev* 18 (1), 93-102, doi: 10.1089/scd.2008.0030.

- Pelttari, K., Mumme, M., Barbero, A. und Martin, I. (2017). **Nasal chondrocytes as a neural crest-derived cell source for regenerative medicine.** *Curr Opin Biotechnol* 47, 1-6, doi: 10.1016/j.copbio.2017.05.007.
- Pelttari, K., Steck, E. und Richter, W. (2008). **The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis.** *Injury* 39 *Suppl 1*, S58-65, doi: 10.1016/j.injury.2008.01.038.
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T. und Richter, W. (2006). **Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice.** *Arthritis Rheum* 54 (10), 3254-3266, doi: 10.1002/art.22136.
- Perera, P. M., Wypasek, E., Madhavan, S., Rath-Deschner, B., Liu, J., Nam, J., Rath, B., Huang, Y., Deschner, J., Piesco, N., Wu, C. und Agarwal, S. (2010). **Mechanical signals control SOX-9, VEGF, and c-Myc expression and cell proliferation during inflammation via integrin-linked kinase, B-Raf, and ERK1/2-dependent signaling in articular chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 12 (3), R106, doi: 10.1186/ar3039.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. und Marshak, D. R. (1999). **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 284 (5411), 143-147, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- Pountos, I., Giannoudis, P. V., Jones, E., English, A., Churchman, S., Field, S., Ponchel, F., Bird, H., Emery, P. und McGonagle, D. (2011). **NSAIDs inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man.** *J Cell Mol Med* 15 (3), 525-534, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01006.x.
- Pountos, I., Panteli, M., Walters, G. und Giannoudis, P. V. (2021). **NSAIDs inhibit bone healing through the downregulation of TGF-beta3 expression during endochondral ossification.** *Injury* 52 (6), 1294-1299, doi: 10.1016/j.injury.2021.01.007.
- Praxenthaler, H., Kramer, E., Weisser, M., Hecht, N., Fischer, J., Grossner, T. und Richter, W. (2018). **Extracellular matrix content and WNT/beta-catenin levels of cartilage determine the chondrocyte response to compressive load.** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864 (3), 851-859, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.12.024.
- Racunica, T. L., Teichtahl, A. J., Wang, Y., Wluka, A. E., English, D. R., Giles, G. G., O'Sullivan, R. und Cicuttini, F. M. (2007). **Effect of physical activity on articular knee joint structures in community-based adults.** *Arthritis Rheum* 57 (7), 1261-1268, doi: 10.1002/art.22990.
- Richardson, S. M., Kalamegam, G., Pushparaj, P. N., Matta, C., Memic, A., Khademhosseini, A., Mobasheri, R., Poletti, F. L., Hoyland, J. A. und Mobasheri, A. (2016). **Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration.** *Methods* 99, 69-80, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015.
- Richter, D. L., Schenck, R. C., Jr., Wascher, D. C. und Treme, G. (2016). **Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature.** *Sports Health* 8 (2), 153-160, doi: 10.1177/1941738115611350.
- Rim, Y. A., Nam, Y. und Ju, J. H. (2020). **The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression.** *Int J Mol Sci* 21 (7), doi: 10.3390/ijms21072358.
- Roca-Cusachs, P., Iskratsch, T. und Sheetz, M. P. (2012). **Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways.** *J Cell Sci* 125 (Pt 13), 3025-3038, doi: 10.1242/jcs.095794.
- Roos, E. M. und Dahlberg, L. (2005). **Positive effects of moderate exercise on glycosaminoglycan content in knee cartilage: a four-month, randomized, controlled trial in patients at risk of osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 52 (11), 3507-3514, doi: 10.1002/art.21415.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M. und Bianco, P. (2007). **Self-renewing osteoprogenitors in bone**

- marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment.** *Cell* 131 (2), 324-336, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.025.
- Sah, R. L., Kim, Y. J., Doong, J. Y., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H. und Sandy, J. D. (1989). **Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression.** *J Orthop Res* 7 (5), 619-636, doi: 10.1002/jor.1100070502.
- San Antonio, J. D. und Tuan, R. S. (1986). **Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations.** *Dev Biol* 115 (2), 313-324, doi: 10.1016/0012-1606(86)90252-6.
- Sanchez-Adams, J., Leddy, H. A., McNulty, A. L., O'Connor, C. J. und Guilak, F. (2014). **The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis.** *Curr Rheumatol Rep* 16 (10), 451, doi: 10.1007/s11926-014-0451-6.
- Sarem, M., Heizmann, M., Barbero, A., Martin, I. und Shastri, V. P. (2018). **Hyperstimulation of CaSR in human MSCs by biomimetic apatite inhibits endochondral ossification via temporal down-regulation of PTH1R.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (27), E6135-E6144, doi: 10.1073/pnas.1805159115.
- Sato, M., Ochi, T., Nakase, T., Hirota, S., Kitamura, Y., Nomura, S. und Yasui, N. (1999). **Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis.** *J Bone Miner Res* 14 (7), 1084-1095, doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1084.
- Sawatjui, N., Limpaboon, T., Schrobback, K. und Klein, T. (2018). **Biomimetic scaffolds and dynamic compression enhance the properties of chondrocyte- and MSC-based tissue-engineered cartilage.** *J Tissue Eng Regen Med* 12 (5), 1220-1229, doi: 10.1002/term.2653.
- Schatti, O., Grad, S., Goldhahn, J., Salzmann, G., Li, Z., Alini, M. und Stoddart, M. J. (2011). **A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells.** *Eur Cell Mater* 22, 214-225, doi: 10.22203/ecm.v022a17.
- Schiavi, J., Reppel, L., Charif, N., de Isla, N., Mainard, D., Benkirane-Jessel, N., Stoltz, J. F., Rahouadj, R. und Huselstein, C. (2018). **Mechanical stimulations on human bone marrow mesenchymal stem cells enhance cells differentiation in a three-dimensional layered scaffold.** *J Tissue Eng Regen Med* 12 (2), 360-369, doi: 10.1002/term.2461.
- Schmidt, C., Pommerenke, H., Durr, F., Nebe, B. und Rychly, J. (1998). **Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins.** *J Biol Chem* 273 (9), 5081-5085, doi: 10.1074/jbc.273.9.5081.
- Scholtes, S., Kramer, E., Weisser, M., Roth, W., Luginbuhl, R., Grossner, T. und Richter, W. (2018). **Global chondrocyte gene expression after a single anabolic loading period: Time evolution and re-inducibility of mechano-responses.** *J Cell Physiol* 233 (1), 699-711, doi: 10.1002/jcp.25933.
- Schuetz, H. B., Kraeutler, M. J. und McCarty, E. C. (2017). **Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation in the Knee: A Systematic Review of Mid- to Long-Term Clinical Outcomes.** *Orthop J Sports Med* 5 (6), 2325967117709250, doi: 10.1177/2325967117709250.
- Schulz, J. N., Nuchel, J., Niehoff, A., Bloch, W., Schonborn, K., Hayashi, S., Kamper, M., Brinckmann, J., Plomann, M., Paulsson, M., Krieg, T., Zaucke, F. und Eckes, B. (2016). **COMP-assisted collagen secretion--a novel intracellular function required for fibrosis.** *J Cell Sci* 129 (4), 706-716, doi: 10.1242/jcs.180216.
- Searls, R. L., Hilfer, S. R. und Mirow, S. M. (1972). **An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud.** *Dev Biol* 28 (1), 123-137, doi: 10.1016/0012-1606(72)90131-5.
- Seguin, C. A. und Bernier, S. M. (2003). **TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways.** *J Cell Physiol* 197 (3), 356-369, doi: 10.1002/jcp.10371.

- Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. und Prockop, D. J. (2002). **In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (7), 4397-4402, doi: 10.1073/pnas.052716199.
- Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., John, T., Rahmanzadeh, M., Rahmanzadeh, R. und Merker, H. J. (2001). **Inhibition of mitogen-activated protein kinase induces apoptosis of human chondrocytes.** *J Biol Chem* 276 (16), 13289-13294, doi: 10.1074/jbc.M010859200.
- Shen, Y., Xu, Y., Yi, B., Wang, X., Tang, H., Chen, C. und Zhang, Y. (2021). **Engineering a Highly Biomimetic Chitosan-Based Cartilage Scaffold by Using Short Fibers and a Cartilage-Decellularized Matrix.** *Biomacromolecules* 22 (5), 2284-2297, doi: 10.1021/acs.biomac.1c00366.
- Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F. und Hiraki, Y. (1996). **Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor.** *J Cell Biol* 133 (2), 457-468, doi: 10.1083/jcb.133.2.457.
- Siddhivarn, C., Banes, A., Champagne, C., Riche, E. L., Weerapradist, W. und Offenbacher, S. (2007). **Mechanical loading and delta12prostaglandin J2 induce bone morphogenetic protein-2, peroxisome proliferator-activated receptor gamma-1, and bone nodule formation in an osteoblastic cell line.** *J Periodontol Res* 42 (5), 383-392, doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00965.x.
- Sitcheran, R., Cogswell, P. C. und Baldwin, A. S., Jr. (2003). **NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism.** *Genes Dev* 17 (19), 2368-2373, doi: 10.1101/gad.1114503.
- Smith, R. K., Gerard, M., Dowling, B., Dart, A. J., Birch, H. L. und Goodship, A. E. (2002). **Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons.** *Equine Vet J Suppl* (34), 241-244, doi: 10.1111/j.2042-3306.2002.tb05426.x.
- Smith, R. L., Donlon, B. S., Gupta, M. K., Mohtai, M., Das, P., Carter, D. R., Cooke, J., Gibbons, G., Hutchinson, N. und Schurman, D. J. (1995). **Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro.** *J Orthop Res* 13 (6), 824-831, doi: 10.1002/jor.1100130604.
- Sobue, T., Yeh, W. C., Chhibber, A., Utreja, A., Diaz-Doran, V., Adams, D., Kalajzic, Z., Chen, J. und Wadhwa, S. (2011). **Murine TMJ loading causes increased proliferation and chondrocyte maturation.** *J Dent Res* 90 (4), 512-516, doi: 10.1177/0022034510390810.
- Sodersten, F., Ekman, S., Eloranta, M. L., Heinegard, D., Dudhia, J. und Hultenby, K. (2005). **Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon.** *Matrix Biol* 24 (5), 376-385, doi: 10.1016/j.matbio.2005.06.003.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A. und Rodeo, S. A. (2009). **The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.** *Sports Health* 1 (6), 461-468, doi: 10.1177/1941738109350438.
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Singleton, S. B. und Briggs, K. K. (1997). **Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results.** *Operative Techniques in Orthopaedics* 7 (4), 300-304, doi: 10.1016/s1048-6666(97)80033-x.
- Steinmetz, N. J., Aisenbrey, E. A., Westbrook, K. K., Qi, H. J. und Bryant, S. J. (2015). **Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering.** *Acta Biomater* 21, 142-153, doi: 10.1016/j.actbio.2015.04.015.

- Steinmetz, N. J. und Bryant, S. J. (2011). **The effects of intermittent dynamic loading on chondrogenic and osteogenic differentiation of human marrow stromal cells encapsulated in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels.** *Acta Biomater* 7 (11), 3829-3840, doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.031.
- Steinmetz, N. J. und Bryant, S. J. (2012). **Chondroitin sulfate and dynamic loading alter chondrogenesis of human MSCs in PEG hydrogels.** *Biotechnol Bioeng* 109 (10), 2671-2682, doi: 10.1002/bit.24519.
- Steinwachs, M. (2009). **New technique for cell-seeded collagen-matrix-supported autologous chondrocyte transplantation.** *Arthroscopy* 25 (2), 208-211, doi: 10.1016/j.arthro.2008.10.009.
- Stirpe, N. S. und Goetinck, P. F. (1989). **Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb.** *Development* 107 (1), 23-33, doi: 10.1242/dev.107.1.23.
- Stockwell, R. A. (1967). **The cell density of human articular and costal cartilage.** *J Anat* 101 (Pt 4), 753-763.
- Stok, K. S., Lisignoli, G., Cristino, S., Facchini, A. und Muller, R. (2010). **Mechano-functional assessment of human mesenchymal stem cells grown in three-dimensional hyaluronan-based scaffolds for cartilage tissue engineering.** *J Biomed Mater Res A* 93 (1), 37-45, doi: 10.1002/jbm.a.32503.
- Strobel, P. und Herrmann, K. (2006). **Very low rubber hardness: A new hardness testing method for supersoft elastomers.** *KGK. Kautschuk, Gummi, Kunststoffe* 59 (7-8), 377-381.
- Stücker, S., Bollmann, M., Garbers, C. und Bertrand, J. (2021). **The role of calcium crystals and their effect on osteoarthritis pathogenesis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 35 (4), 101722, doi: 10.1016/j.berh.2021.101722.
- Studer, R., Jaffurs, D., Stefanovic-Racic, M., Robbins, P. D. und Evans, C. H. (1999). **Nitric oxide in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 7 (4), 377-379, doi: 10.1053/joca.1998.0216.
- Sun, K., Liu, F., Wang, J., Guo, Z., Ji, Z. und Yao, M. (2017). **The effect of mechanical stretch stress on the differentiation and apoptosis of human growth plate chondrocytes.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 53 (2), 141-148, doi: 10.1007/s11626-016-0090-5.
- Suzuki, R., Nemoto, E. und Shimauchi, H. (2014). **Cyclic tensile force up-regulates BMP-2 expression through MAP kinase and COX-2/PGE2 signaling pathways in human periodontal ligament cells.** *Exp Cell Res* 323 (1), 232-241, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.013.
- Swiderski, R. E. und Solursh, M. (1992). **Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton.** *Dev Dyn* 194 (2), 118-127, doi: 10.1002/aja.1001940205.
- Takahashi, M. und Berk, B. C. (1996). **Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase.** *J Clin Invest* 98 (11), 2623-2631, doi: 10.1172/JCI119083.
- Takahata, Y., Murakami, T., Hata, K. und Nishimura, R. (2021). **Molecular Mechanisms Involved in the Progression and Protection of Osteoarthritis.** *Curr Mol Pharmacol* 14 (2), 165-169, doi: 10.2174/1874467213666200417122933.
- Tanaka, N., Ohno, S., Honda, K., Tanimoto, K., Doi, T., Ohno-Nakahara, M., Tafolla, E., Kapila, S. und Tanne, K. (2005). **Cyclic mechanical strain regulates the PTHrP expression in cultured chondrocytes via activation of the Ca²⁺ channel.** *J Dent Res* 84 (1), 64-68, doi: 10.1177/154405910508400111.
- Taskiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H. und Evans, C. (1994). **Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1.** *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1), 142-148, doi: 10.1006/bbrc.1994.1426.

- Thielen, N. G. M., van der Kraan, P. M. und van Caam, A. P. M. (2019). **TGFbeta/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis**. *Cells* 8 (9), doi: 10.3390/cells8090969.
- Thorogood, P. V. und Hinchliffe, J. R. (1975). **An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb**. *J Embryol Exp Morphol* 33 (3), 581-606.
- Vina, E. R. und Kwok, C. K. (2018). **Epidemiology of osteoarthritis: literature update**. *Curr Opin Rheumatol* 30 (2), 160-167, doi: 10.1097/BOR.0000000000000479.
- Vinatier, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J. M., Jorgensen, C., Weiss, P., Guicheux, J. und Noel, D. (2009). **Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy**. *Curr Stem Cell Res Ther* 4 (4), 318-329, doi: 10.2174/157488809789649205.
- Vincent, T. L., Hermansson, M. A., Hansen, U. N., Amis, A. A. und Saklatvala, J. (2004). **Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded**. *Arthritis Rheum* 50 (2), 526-533, doi: 10.1002/art.20047.
- Vincent, T. L., McLean, C. J., Full, L. E., Peston, D. und Saklatvala, J. (2007). **FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer**. *Osteoarthritis Cartilage* 15 (7), 752-763, doi: 10.1016/j.joca.2007.01.021.
- Visser, A. W., de Mutsert, R., le Cessie, S., den Heijer, M., Rosendaal, F. R., Kloppenburg, M. und Group, N. E. O. S. (2015). **The relative contribution of mechanical stress and systemic processes in different types of osteoarthritis: the NEO study**. *Ann Rheum Dis* 74 (10), 1842-1847, doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205012.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. und Tabin, C. J. (1996). **Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein**. *Science* 273 (5275), 613-622, doi: 10.1126/science.273.5275.613.
- Wadhwa, S., Choudhary, S., Voznesensky, M., Epstein, M., Raisz, L. und Pilbeam, C. (2002). **Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway**. *Biochem Biophys Res Commun* 297 (1), 46-51, doi: 10.1016/s0006-291x(02)02124-1.
- Wang, D., Taboas, J. M. und Tuan, R. S. (2011). **PTHrP overexpression partially inhibits a mechanical strain-induced arthritic phenotype in chondrocytes**. *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2), 213-221, doi: 10.1016/j.joca.2010.11.003.
- Wang, N., Butler, J. P. und Ingber, D. E. (1993). **Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton**. *Science* 260 (5111), 1124-1127, doi: 10.1126/science.7684161.
- Wang, P., Zhu, F., Lee, N. H. und Konstantopoulos, K. (2010). **Shear-induced interleukin-6 synthesis in chondrocytes: roles of E prostanoic acid (EP) 2 and EP3 in cAMP/protein kinase A- and PI3-K/Akt-dependent NF-kappaB activation**. *J Biol Chem* 285 (32), 24793-24804, doi: 10.1074/jbc.M110.110320.
- Watanabe, H., de Caestecker, M. P. und Yamada, Y. (2001). **Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells**. *J Biol Chem* 276 (17), 14466-14473, doi: 10.1074/jbc.M005724200.
- Weiss, S., Henle, P., Roth, W., Bock, R., Boeuf, S. und Richter, W. (2011). **Design and characterization of a new bioreactor for continuous ultra-slow uniaxial distraction of a three-dimensional scaffold-free stem cell culture**. *Biotechnol Prog* 27 (1), 86-94, doi: 10.1002/btpr.510.
- Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E. und Richter, W. (2010). **Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**. *J Cell Physiol* 223 (1), 84-93, doi: 10.1002/jcp.22013.

- Wescott, D. C., Pinkerton, M. N., Gaffey, B. J., Beggs, K. T., Milne, T. J. und Meikle, M. C. (2007). **Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension.** *J Dent Res* 86 (12), 1212-1216, doi: 10.1177/154405910708601214.
- Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Weber, R. M., Ewerbeck, V. und Richter, W. (2003). **Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells.** *Arthritis Rheum* 48 (2), 418-429, doi: 10.1002/art.10767.
- Wong, M., Siegrist, M. und Goodwin, K. (2003). **Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes.** *Bone* 33 (4), 685-693, doi: 10.1016/s8756-3282(03)00242-4.
- Wright, M. O., Nishida, K., Bavington, C., Godolphin, J. L., Dunne, E., Walmsley, S., Jobanputra, P., Nuki, G. und Salter, D. M. (1997). **Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for alpha 5 beta 1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor.** *J Orthop Res* 15 (5), 742-747, doi: 10.1002/jor.1100150517.
- Wu, M., Chen, G. und Li, Y. P. (2016). **TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease.** *Bone Res* 4, 16009, doi: 10.1038/boneres.2016.9.
- Xie, M., Fritch, M., He, Y., Fu, H., Hong, Y. und Lin, H. (2021). **Dynamic loading enhances chondrogenesis of human chondrocytes within a biodegradable resilient hydrogel.** *Biomater Sci* 9 (14), 5011-5024, doi: 10.1039/d1bm00413a.
- Xu, T., Yang, K., You, H., Chen, A., Wang, J., Xu, K., Gong, C., Shao, J., Ma, Z., Guo, F. und Qi, J. (2013). **Regulation of PTHrP expression by cyclic mechanical strain in postnatal growth plate chondrocytes.** *Bone* 56 (2), 304-311, doi: 10.1016/j.bone.2013.06.027.
- Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. und Yamamoto, S. (1995). **Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells.** *J Biol Chem* 270 (52), 31315-31320, doi: 10.1074/jbc.270.52.31315.
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., Tobe, K. und et al. (1995). **Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes.** *J Clin Invest* 96 (1), 438-446, doi: 10.1172/JCI118054.
- Yang, Y., Wang, Y., Kong, Y., Zhang, X., Zhang, H., Feng, X., Wang, Z., Gao, P., Yan, M., Bai, L. und Li, F. (2020). **Moderate Mechanical Stimulation Protects Rats against Osteoarthritis through the Regulation of TRAIL via the NF-kappaB/NLRP3 Pathway.** *Oxid Med Cell Longev* 2020, 6196398, doi: 10.1155/2020/6196398.
- Yoon, Y. M., Kim, S. J., Oh, C. D., Ju, J. W., Song, W. K., Yoo, Y. J., Huh, T. L. und Chun, J. S. (2002). **Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase.** *J Biol Chem* 277 (10), 8412-8420, doi: 10.1074/jbc.M110608200.
- Zhang, T., Wen, F., Wu, Y., Goh, G. S., Ge, Z., Tan, L. P., Hui, J. H. und Yang, Z. (2015). **Cross-talk between TGF-beta/SMAD and integrin signaling pathways in regulating hypertrophy of mesenchymal stem cell chondrogenesis under deferral dynamic compression.** *Biomaterials* 38, 72-85, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.010.

Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung

Diese Arbeit wurde zu über 90 % von mir selbst im Rahmen des DFG-Projekts (RI707/12-1 and RI707/12-2) ExCarbon (FOR2407) durchgeführt. Aufgrund der Übernahme des Projektes sind wenige Teile der vorgelegten Ergebnisse von Elisabeth Raqué (geb. Krämer) durchgeführt worden. Dazu gehören in Abbildung 8-10, 11, 13-15, 17-18, 27 und 35-37 die Daten für je 3 AC- und MSC-Spenderpopulationen. Für die Vollständigkeit, auch im Hinblick auf die Publikation, wurden die Daten in der vorliegenden Arbeit aufgeführt. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits vorab in Praxenthaler et al. 2018 publiziert. Diese Daten wurden in keiner anderen Doktorarbeit veröffentlicht.

Des Weiteren wurden in Abbildung 12 die Integrinexpression der AC und in Abbildung 16 die microRNA-Expression der AC von Dr. Nicole Hecht erhoben. Für die Vollständigkeit im Hinblick auf das ExCarbon-Projekt wurden diese Daten in der vorliegenden Arbeit mit aufgeführt.

Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Aus der Promotion entstandene Veröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Aufsätzen vorab publiziert:

Lückgen, J., Raqué, E., Reiner, T., Diederichs, S. und Richter, W. (2022). *NFκB inhibition to lift the mechano-competence of mesenchymal stromal cell-derived neocartilage toward articular chondrocyte levels*. Stem Cell Research & Therapy 13 (1), 1-15, doi: 10.1186/s13287-022-02843-x

Impact Factor (2021): 8,098

- Diese Publikation umfasst zu weiten Teilen die Kapitel 4.2, 4.3, und 4.4.1-4.4.5.1. Auch die Diskussion der Bedeutung von NFκB, NO und PGE₂ (Kapitel 5.5.2-5.5.3.1) wurde in dieser Publikation inhaltlich abgebildet und in der vorliegenden Arbeit näher ausgeführt. Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckt sich auf die Erhebung der Daten (gemeinsam mit Elisabeth Raqué), die Auswertung der Daten und das Schreiben des Manuskriptentwurfs, insbesondere der Einleitung, des Material- und Methodenteils und des Ergebnisteils, der meine Daten beschreibt.

Weitere eigene Veröffentlichungen

Lueckgen, J., Vanoye, L., Philippe, R., Eternot, M., Fongarland, P., de Bellefon, C. und Favre-Réguillon, A. (2018). *Simple and selective conversion of fructose into HMF using extractive-reaction process in microreactor*. Journal of Flow Chemistry 8 (1), 3-9, doi: 10.1007/s41981-018-0004-7

Diederichs, S., Linn, K., Lückgen, J., Klement, T., Grosch, J.-H., Honda, K., Ohtake, H. und Büchs, J. (2015). *High-level production of (5S)-hydroxyhexane-2-one by two thermostable oxidoreductases in a whole-cell catalytic approach*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 121, 37-44, doi: 10.1016/j.molcatb.2015.08.001

Tagungsbeiträge

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Kongressen präsentiert.

Vorträge

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.
The Influence of Osteoarthritic Changes in Chondrocytes on the Response to Mechanical Stimulation
Deutsche Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB 2019), Regensburg

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.
Osteoarthritic Changes in Chondrocytes Influence the Response to Mechanical Stimulation
27th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society (EORS 2019), Maastricht, NL

Abstract publiziert:

Lueckgen, J., Kraemer, E., Reiner, T., & Richter, W. (2021, March). *Osteoarthritic Changes in Chondrocytes Influence the Response to Mechanical Stimulation*. In *Orthopaedic Proceedings* (Vol. 103, No. SUPP_4, pp. 115-115). The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery, doi: 10.1302/1358-992x.2021.4.115.

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.
Folgen OA-typischer Veränderungen von Chondrozyten auf die mechanische Belastungsantwort
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2019 (DKOU 2019), Berlin

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.
Zonal design of cartilage implants: Mechanotolerance of chondrocytes as a selection criterium for implant design.
Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 6th World Congress, Maastricht, NL

Poster

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.

The Influence of Osteoarthritic Changes in Chondrocytes on the Response to Mechanical Stimulation

Deutsche Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB 2019), Regensburg

Kreuser, U., Lückgen, J., Richter, W., Diederichs, S.

Short initial WNT/ β -catenin stimulation improves cell survival and tissue yield during chondrogenic differentiation of iPSCs

27th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society (EORS 2019), Maastricht, NL

Lückgen, J., Krämer, E., Reiner, T., Richter, W.

Altered susceptibility to mechanical loading by hypertrophic degeneration of chondrocytes Osteoarthritis Research Society International (OARSI), OARSI Connect '21 Virtual World Congress on Osteoarthritis, Online Meeting.

Poster + Kurzpräsentation

Abstract publiziert:

Lueckgen, J., Kraemer, E., Reiner, T. und Richter, W. (2021). *Altered susceptibility to mechanical loading by hypertrophic degeneration of chondrocytes*. Osteoarthritis and Cartilage 29, S211, doi: 10.1016/j.joca.2021.02.287.

Preise und Auszeichnungen

Young investigator oral presentation in biology

Lückgen, J.

Osteoarthritic Changes in Chondrocytes Influence the Response to Mechanical Stimulation

27th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society (EORS 2019) in Maastricht, NL

Anhang

Verwendetes Belastungsprotokoll für AC-basiertes Knorpelersatzgewebe

#OSZI42

```

NO _____ REFERENCE MOVE _____
NO
SHX
DP0;NO          SET POSITION COUNTER TO ZERO
#INDEX
NO              MOVE TO FIND HARD END
JG20000
BGX
MG"SUCHE HARDANSCHLAG"
#LOOP1;NO      CHECK BUILDUP OF POSITION ERROR
JP#LOOP1,_TEX<10000;NO  IF NO MORE MOOVEMENT EXIT LOOP1
NO
STX
AMX
NO              FIND INDEX
JG-10000
MG"STARTE INDEX SUCHLAUF"
FIX
BGX
AMX
MG"INDEX GEFUNDEN, NULLPUNKT GESETZT"
WT20000;NO     WAIT 20 SEC
NO
NO _____ SINUSOIDIAL MOVE PROGRAMM _____
NO
#SINUS
n= 0;NO
#LOOP
NO
MG "Starte Pause"
AM
WT600000;NO    WAIT 10 min
PR-2250
BGX
MG "Nulllage auf -2250 gesetzt, Starte Sinus"
AM
VM XN;NO      N IS THE VIRTUAL AXIS
VA 68000000
VD 68000000
VS 14137;NO   VS=2*PI*RADIUS*f
NO           DOING 10 CYCLES (3600 DEG)
i= 0;NO
#KREIS
CR 2250,90,21600;NO  RADIUS, START DEG., STOP DEG.
VE
BGS
AM
i= i+1;NO
JP#KREIS,i<10;NO
AM
PR2250
BGX
MG "Nulllage auf 0 gesetzt"
n= n+1;NO
JP#LOOP,n<9;NO     INFINITE LOOP
AM
MG "Ende"
EN

```

Anhang

NO _____ PROGRAMM END _____

Verwendetes Belastungsprotokoll für MSC-basiertes Knorpelersatzgewebe

#OSZId21

NO _____ REFERENCE MOVE _____

NO

SHX

DP0;NO SET POSITION COUNTER TO ZERO

#INDEX

NO MOVE TO FIND HARD END

JG20000

BGX

MG"SUCHE HARDANSCHLAG"

#LOOP1;NO CHECK BUILDUP OF POSITION ERROR

JP#LOOP1,_TEX<10000;NO IF NO MORE MOOVEMENT EXIT LOOP1

NO

STX

AMX

NO FIND INDEX

JG-10000

MG"STARTE INDEX SUCHLAUF"

FIX

BGX

AMX

MG"INDEX GEFUNDEN, NULLPUNKT GESETZT"

WT20000;NO WAIT 20 SEC

NO

NO _____ SINUSOIDIAL MOVE PROGRAMM _____

NO

#SINUS

n= 0;NO

#LOOP

NO

MG "Starte Pause"

AM

WT600000;NO WAIT 10 min

PR-1650

BGX

MG "Nulllage auf -1650 gesetzt, Starte Sinus"

AM

VM XN;NO N IS THE VIRTUAL AXIS

VA 68000000

VD 68000000

VS 10367;NO VS=2*PI*RADIUS*f

NO DOING 10 CYCLES (3600 DEG)

i= 0;NO

#KREIS

CR 1650,90,21600;NO RADIUS, START DEG., STOP DEG.

VE

BGS

AM

i= i+1;NO

JP#KREIS,i<10;NO

AM

PR1650

BGX

MG "Nulllage auf 0 gesetzt"

n= n+1;NO

JP#LOOP,n<9;NO INFINITE LOOP

AM

MG "Ende"

EN

NO _____ PROGRAMM END _____

XIV

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Nachname	Janine Lückgen
Geburtsdatum	21.09.1990
Geburtsort	Leverkusen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Universitärer Werdegang:

Seit 12/2018	Annahme als Doktorandin an der Medizinischen Fakultät der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg
03/2017 – 05/2022	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Heidelberg Promotion: Zentrum für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie, Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie
02/2014 – 07/2014	Forschungspraktikum am Institute of research on catalysis and the environment of Lyon und LGPC der Claude Bernard Lyon 1 University in Lyon, Frankreich
10/2013 – 09/2016	Masterstudium an der RWTH Aachen Masterarbeit am Institut für Angewandte Medizintechnik Abschluss: Master of Science (Molekulare und Angewandte Biotechnologie)
10/2010 – 09/2013	Bachelorstudium an der RWTH Aachen Bachelorarbeit: Aachener Verfahrenstechnik; Abteilung Bioverfahrenstechnik Abschluss: Bachelor of Science (Biotechnologie)

Schulischer Werdegang:

09/2001 - 07/2010	Werner-Heisenberg-Gymnasium in Leverkusen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-------------------	---

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Wiltrud Richter für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit zu diesem spannenden Thema durchführen zu können, für die hochwertige wissenschaftliche Ausbildung, die fachliche Unterstützung, die Bereitstellung der exzellenten Forschungsmöglichkeiten und die stete Motivation, über mich hinauszuwachsen. Danke Wiltrud, dass du mir die Erstellung einer wissenschaftlichen Originalarbeit und die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen ermöglicht hast. Ich habe viel von dir gelernt.

Mein Dank gilt auch allen Ärzt*innen für die Aufklärung der Patient*innen und die Versorgung mit Knorpelproben und Knochenmarkaspiraten. Ich möchte mich auch bei Dr. Reto Luginbuehl und der RMS Foundation für die freundliche Bereitstellung des Knochenersatzmaterials β -TCP bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Solvig Diederichs, Dr. Jennifer Fischer, Dr. Justyna Buchert, Dr. Svitlana Melnik und Dr. Safak Chasan dafür, dass sie ihre wissenschaftliche Expertise mit mir geteilt haben und ich mich jederzeit bei Problemen oder Denkblockaden auf ihren Rat verlassen konnte.

Ich danke Helen Dietmar dafür, dass sie sich die Zeit genommen hat, mich auf den einen oder anderen Rechtschreibfehler in dieser Arbeit hinzuweisen.

Vielen Dank an Dr. Nicole Hecht für die Einarbeitung in die Labormethoden und die Einführung in die Welt des Bioreaktors. Tanja Sims danke ich herzlich für die kompetente Einarbeitung in die Zellkultur.

Danke an Birgit Frey für die exzellente histologische Beratung sowie Petra Glück und Tetyana Fragnito für ihren kontinuierlichen und liebevollen Einsatz, uns den Laboralltag zu erleichtern. Vielen Dank auch den TAs, insbesondere Barbara König und Carina Binder, für die eine oder andere Entlastung gerade zum Ende des Projekts.

Meinen Mitdoktorand*innen Felicia Kampfleuthner, Tim Hammersen und Malina Krüger danke ich von ganzem Herzen für die emotionale und fachliche Unterstützung besonders in den kritischen Phasen des Projekts und dafür, dass ich bei allen Fragen und Problemen – beruflich wie privat – jederzeit zu euch kommen durfte.

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter*innen des Labors für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und den immensen Zusammenhalt aussprechen. Danke für eure Unterstützung bei allen kleineren und größeren Problemen und

die vielen schönen und lustigen Momente. Ihr seid fest in vielen wertvollen Erinnerungen während meiner Promotionszeit verankert und ich bin sehr dankbar dafür, dass ich in euch nicht nur Kolleg*innen, sondern auch gute Freund*innen finden konnte.

Ich danke meinen Freund*innen, insbesondere Isabelle Pinnow, Benjamin Kaminski, Stefanie Riske, Aitana Gisbert Nieto und Laura Schulz für ihr Verständnis und ihren Rückhalt, der mir viel Kraft und Durchhaltevermögen in schwierigeren Lebenslagen gegeben hat.

Mein Dank gilt auch Familie Fath für ihre Herzlichkeit, die mir Wärme und Mut gegeben hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihr bedingungsloses Vertrauen und ihre unendliche Unterstützung. Stefanie, danke, dass du, trotz all unserer Unterschiede, immer an mich glaubst. Oma, danke, dass du immer stolz auf mich bist, auch dann, wenn ich selbst erst an den Punkt gelangen muss. Opa, danke, dass du mich durch deinen unstillbaren Wissensdurst zum Forschen inspiriert hast. Du fehlst mir. Mama und Papa, ich kann gar nicht in Worte fassen, wie viel mir euer Rückhalt bedeutet. Ich danke euch dafür, dass ihr immer für mich da seid und mich in schwierigen Momenten dazu motiviert, nicht aufzugeben. Danke, dass ihr mich zu dem Menschen gemacht habt, der ich heute bin.

Andi, ich danke dir für deine Geduld, dein Verständnis, deinen Rückhalt und deine Unterstützung und dafür, dass du trotz aller Entbehrungen in den letzten Monaten immer für mich da warst.

Ohne euch alle gäbe es diese Arbeit nicht.

Danke!

Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Biologische Mechanokompetenz von humanem Knorpelersatzgewebe: die Rolle von Zellherkunft und Signalkaskaden

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Hiddlberg, 30.06.22

Ort und Datum

Janine Dückgen

Unterschrift