

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung einer biomimetischen Hybrid-Biomatrix aus  
Seidenfibroin und Hyaluronsäure als Trägersystem für die  
Autologe Knorpelzelltransplantation

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Bastian Nußpickel  
aus Menden (Sauerland)

Kiel 2023

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung einer biomimetischen Hybrid-Biomatrix aus  
Seidenfibroin und Hyaluronsäure als Trägersystem für die  
Autologe Knorpelzelltransplantation

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Bastian Nußpickel  
aus Menden (Sauerland)

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Behrendt,  
Anatomisches Institut der CAU zu Kiel

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Maciej Jakub Kai Simon,  
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, UKSH Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.10.2024

gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Behrendt  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis.....	III
II. Tabellenverzeichnis.....	IV
III. Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der hyaline Gelenkknorpel .....	1
1.2 Der fokale Knorpelschaden.....	3
1.3 Grundlagen der klinischen Behandlung des fokalen Knorpelschadens .....	4
1.3.1 Tissue Engineering und Autologe Chondrozytentransplantation .....	6
1.4 Seidenfibroin als Biomaterial .....	8
1.4.1 Hyaluronsäure-Hydrogele als Biomaterial .....	9
1.4.2 Fragestellung .....	10
<b>2 Materialien .....</b>	<b>11</b>
2.1 Biomaterialien .....	11
2.1.1 Seidenfibroinmatrix.....	11
2.1.2 Hyaluronsäure-Tyramin-Hydrogel .....	12
2.2 Kulturmedien und Lösungen .....	13
2.3 Gebrauchsfertige Kits .....	14
2.4 Enzyme.....	14
2.5 Antikörper .....	15
2.6 Chemische Substanzen und Lösungen .....	15
2.7 Laborgeräte .....	16
2.8 Verbrauchsgegenstände.....	18
2.9 Computersoftware .....	18
<b>3 Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Isolierung humaner Chondrozyten.....	19
3.2 Kultivierung und Passagierung humaner Chondrozyten.....	20
3.3 Vorbereitung der Aussaat und Biomaterialien.....	20
3.4 Aussaat der Chondrozyten in die Seidenmatrizen und das Hydrogel .....	21
3.5 Kultivierung der beimpften Biomaterialien .....	22
3.6 Optimierung des Hydrogels .....	22
3.6.1 Rheologische Untersuchung des HA-Tyr-Hydrogels unter variierender Zellzahl und Konzentration der Vernetzungsreagenzien .....	22
3.6.2 Bestimmung des Zytokompatibilitätsbereiches im Hydrogel mittels CellTiter-Blue-Assay.....	24
3.7 Bestimmung der Zellvitalität mittels Live/ Dead-Färbung.....	25
3.8 Zellmorphologie und Scaffoldarchitektur im Rasterelektronenmikroskop .....	25
3.9 Analyse der Knorpelzelldifferenzierung mittels Echtzeit Reversetranskriptase Polymerase-Kettenreaktion .....	25
3.9.1 Zielgene .....	26
3.9.2 RNA-Isolation .....	27
3.9.3 cDNA-Synthese.....	28
3.9.4 Realtime-qPCR .....	28
3.10 1,9-Dimethylmethylenblau-Assay zur Analyse der Glykosaminoglykane.....	29
3.11 DNA-Quantifizierung.....	30

3.12 Histologie .....	30
3.12.1 Toluidin-Blaufärbung .....	31
3.12.2 Immunhistochemie Kollagen Typ 2 .....	31
3.13 Biomechanische Untersuchung .....	32
3.14 Statistik .....	33
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1 Viskoelastische Eigenschaften des HA-Tyr-Hydrogels unter variierender Zellzahl und Konzentration der Vernetzungsreagenzien.....	34
4.2 Bestimmung des Zytokompatibilitätsbereichs von HA-Tyr-Vernetzungsmitteln	35
4.3 Zellvitalität und -morphologie in 3D Kultur .....	36
4.4 Chondrogene Zelldifferenzierung.....	38
4.5 Chondrogene EZM Neosynthese.....	40
4.6 Histologie und Immunhistochemie .....	41
4.7 Biomechanische Analyse.....	43
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>44</b>
5.1 Limitationen .....	49
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>57</b>
<b>9 Veröffentlichung.....</b>	<b>58</b>
<b>10 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>59</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Schematische und histologische Darstellung des hyalinen Gelenkknorpels	2
2	Zusammenfassendes Flussschema für die Auswahl des geeigneten Verfahrens zur biologischen Rekonstruktion isolierter Knorpelschäden des Kniegelenks	5
3	Diagramm einer Chondrozyten Transplantation	6
4	REM-Aufnahmen eines Seidenscaffolds und Rohvorlage einer Seidenfibroinmatrix	11
5	Schematischer Ablauf der Hydrogelmodifikation und Vernetzung und fertig geliertes Hyaluronsäure-Hydrogel	12
6	Seidenfibroin-HA-Tyr-Hydrogel Hybridscaffold	22
7	Anton Paar Modular Compact Rheometer zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele	23
8	Kompressionstest zur Ermittlung der Gewebeelastizität (Young's Modulus) mittels Instron 5866 Materialprüfmaschine	33
9	Viskoelastische Eigenschaften des HA-Tyr-Hydrogels unter An- bzw. Abwesenheit von Zellen und Konzentration der Vernetzungsreagenzien $H_2O_2$ und HRP	34
10	Metabolische Aktivität der hCh in Abhängigkeit der $H_2O_2$ - und HRP- Konzentration in Monolayerkulturen	35
11	Quantifizierung der Zellviabilität	36
12	Live/Dead-Färbung	37
13	REM-Aufnahmen der SM-Gruppe. L/D-Färbung der SM-Gruppe und der SMHA-Gruppe	37
14	qPCR-Messung der relativen Genexpression chondrogener Marker, Markern der Dedifferenzierung, sowie des COL2A1/COL1A1 Verhältnisses	39
15	Quantifizierung des sGAG-Gehalts und der -Biosynthese im Verhältnis zur DNA der SM- und SMHA-Gruppe und Kumulativer sGAG-Gehalt des Kulturüberstandes	41
16	Histologische Analyse humaner Chondrozyten	42
17	Immunhistochemie humaner Chondrozyten	42
18	Biomechanische Analyse der biologischen Trägersysteme	43
19	Schematische Zeichnung einer knorpelmimetischen Architektur eines Seidenfibroin Scaffolds und histologisches Bild eines hyalinen Gelenkknorpels im Schnitt	47

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Übersicht der Versuchsgruppen	21
2	Humane sense und antisense Primersequenzen	29

### III. Abkürzungsverzeichnis

ACAN	Aggrecan
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
BMS	Bone marrow stimulation
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
COL1	Kollagen Typ I
COL2	Kollagen Typ II
COL10	Kollagen Typ X
CTB-Assay	Cell-Titer-blue-Assay
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS <sub>mol</sub>	Molar degree of substitution (molarer Substitutionsgrad)
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF-2	Fibroblastic growth factor-2
G'	Speichermodul
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	Hyaluronsäure
HA-Tyr	Tyramin-modifizierte Hyaluronsäure (Hydrogel)
hCh	Humane Chondrozyten
HG-DMEM	High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICRS	International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society
ITS	ITS Liquid Media Supplement
L/D-Färbung	Live/Dead-Färbung
MACT	Matrixassoziierte Chondrozytentransplantation
MCR	Modular Compact Rheometer
MEM-NEAA	Eagle's minimum essential medium, non-essential Amino Acid Solution
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
OCT	Osteochondraler Transfer
OD	Optische Dichte



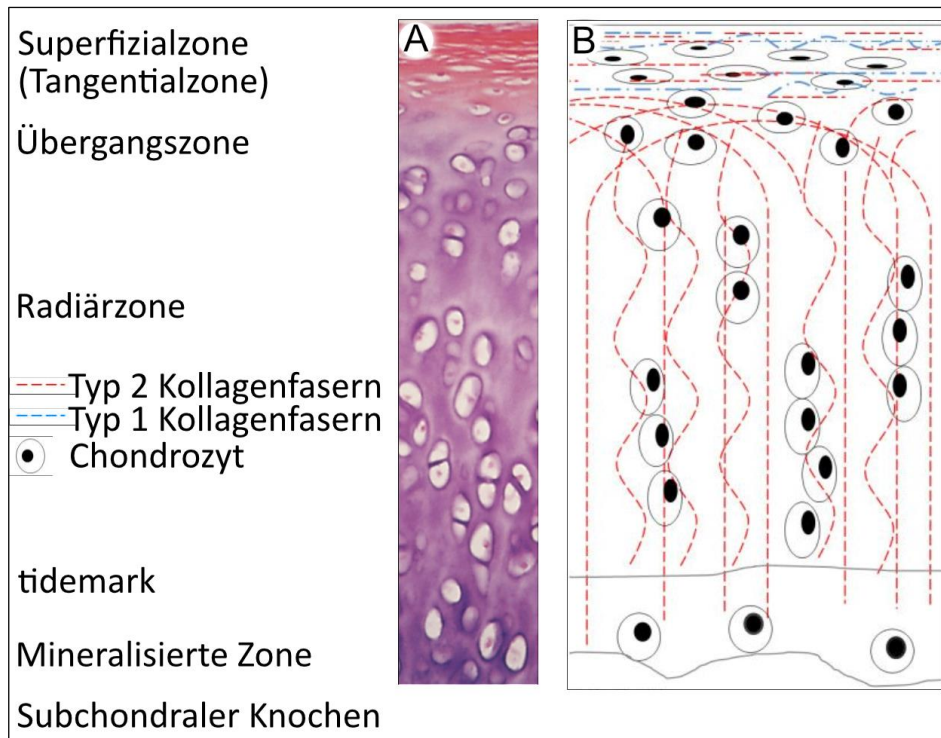
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Proteoglykane
P/S	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
qPCR	Quantitative/ Real-time Polymerase Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFU	Relative fluorescence unit
Sera Plus	Special processed fetal bovine serum
SD	Standardabweichung
SF	Seidenfibroin
sGAG	Sulfatierte Glykosaminoglykan
SM	Seidenfibroinmatrix
SOX 9	SRY-box transcription factor 9
SS	Seidensericin
TBS	Tris buffered saline
TEP	Totale Endoprothese
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor $\beta$ 1
3D	Dreidimensional

# 1 Einleitung

## 1.1 Der hyaline Gelenkknorpel

Der hyaline Knorpel ist das am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe im menschlichen Körper. Im Folgenden soll speziell das in diarthrotischen Gelenken, also solche die über einen Gelenkspalt verfügen, vorkommende, dem Knochen aufliegende, Knorpelgewebe thematisiert werden. Die beheimateten Chondrozyten (Knorpelzellen) haben lichtmikroskopisch einen meist ovalen Phänotyp und kommen einzeln oder in isogenen Gruppen vor. Letztere entstehen, wenn eine noch teilungsfähige Zelle bereits von Extrazellulärmatrix (EZM) umgeben ist und aufgrund dessen eine Migration unmöglich wird. Chondrozyten haben in reifem und gesundem Knorpelgewebe die Funktion EZM zu synthetisieren. Die wichtigsten Matrixbestandteile des hyalinen Gelenkknorpels sind dabei die meist dünneren Kollagenfibrillen des Typ II, Hyaluronsäuren (HA) und Proteoglykane (PG). Des Weiteren sind anteilig Kollagene des Typs I, VI, IX und XI zu finden. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass sich im Gegensatz zu allen anderen Knorpeltypen hier kein Perichondrium (eine feste, bindegewebige Knorpelhaut) oberflächlich auflagert.

Die allgemeine Funktion des Gewebes besteht darin, den bei Belastung entstehenden Druck gleichmäßig auf die Gelenkfläche zu verteilen und das darunter gelegene Knochengewebe vor Abnutzung zu schützen. Essentiell für die gewünschte Druckelastizität, also die reversible Komprimierbarkeit des Gewebes, ist das Zusammenspiel der arkadenartigen Architektur der Kollagenfibrillen (Abb. 1) und die biochemischen Eigenschaften der HA und PGs. Genauer lässt sich die mehrzonale Ultrastruktur des Knorpels in vier Abschnitte unterteilen. Die am oberflächlichsten gelegene Zone wird auch als Tangentialzone bezeichnet. Hier sind die Kollagenfibrillen nahezu parallel zur Oberfläche ausgerichtet und ordnen sich trajektoriell (in Richtung der stärksten Zugspannung) an. Darunter liegt die Übergangszone, gefolgt von der Radiärzone. Hier verlaufen die Fasern beinahe senkrecht in die Tiefe. Zuletzt schließt sich die Zone des mineralisierten Knorpels an, welche mit dem darunterliegenden, subchondralen Knochen verankert ist. Auf dieser Ebene ist die EZM durch Hydroxyapatitkristalle verstärkt.



**Abbildung 1:** Schematische und histologische Darstellung des hyalinen Gelenkknorpels. **A:** Hyaliner Gelenkknorpel im Schnitt. **B:** Zoneneinteilung entsprechend dem Verlauf der Kollagenfibrillen.

Die PGs liegen hauptsächlich als Aggrecan (mit Glukosaminoglykan-Ketten aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat) vor. Die Aggrecan-Monomere bilden zusammen mit der HA ein großes molekulares Netz, welches sich aufgrund von vielen, sich gegenseitig abstoßenden negativen Ladungen, ausdehnen möchte. Zusätzlich führt die Elektronegativität dazu, dass positiv geladene Ionen (v. a. Natrium) dem Spannungsgefälle folgen und dadurch Wasser osmotisch ins Gewebe strömt. Dieses Bestreben wird durch die Kollagenarkaden begrenzt, sodass die PG und die HA nur etwa 20 % ihres geforderten Raumes einnehmen können. Der so entstehende Schwelldruck sorgt dafür, dass sich das Gewebe nach Kompression sprunghaft in seine ursprüngliche Form restrukturiert. Diese Dynamik ist zusätzlich essentiell für die Ernährung der Chondrozyten, da sich in der Regel keine Gefäße im hyalinen Knorpel befinden. Durch regelmäßiges Be- und Entlasten des Gewebes wird den Zellen der Hin- und Abtransport über mehrere Millimeter durch die Knorpelmatrix gewährleistet. Zusätzlich findet ein Nährstoffaustausch auf der oberflächlichen Seite über die Synovia (Gelenkflüssigkeit) statt. Die Synovia ist eine visköse Flüssigkeit, welche zusätzlich als Gleitmittel dient, um eine möglichst reibungsarme Bewegung im Gelenk zu ermöglichen.

Neben dem in dieser Arbeit untersuchten hyalinen Knorpel gibt es zum einen den Faserknorpel, welcher durch den hohen Anteil an Kollagen-Typ-1-Fasern charakterisiert ist und u. a. im Discus intervertebralis (Bandscheibe) oder in Menisken vorkommt und zum anderen den elastischen Knorpel wie er beispielsweise in der Ohrmuschel vorkommt.

## 1.2 Der fokale Knorpelschaden

Bei einem fokalen Knorpelschaden liegt ein isolierter, struktureller Gewebedefekt vor. Das beim Menschen am häufigsten betroffene Gelenk stellt das Knie dar. Genauer wurden durch Curl et al. Daten aus 31.515 Kniegelenksarthroskopie zusammengeführt und unter den tiefen, also den bis zum subchondralen Knochen reichenden Läsionen, die mediale Femurkondyle und die Patella als die am häufigsten betroffenen Lokalisationen beschrieben <sup>[1]</sup>. Als typische Kausalität konnten durch die Analyse von 993 Kniearthroskopien bei Betroffenen (Durchschnittsalter = 35 Jahre) in 59 % der Fälle ein akuter Traumamechanismus als Ursache identifiziert werden <sup>[2]</sup>. Bei den übrigen 41 % berichteten die Betroffenen über einen chronischen Verlauf, ohne ein spezielles Trauma erinnern zu können. Es wurden in 49 % der Fälle, körperliche Betätigungen und Sport, hier speziell Fuß- oder Handball, als Auslöser angegeben. Die Hauptproblematik besteht darin, dass Knorpel lediglich ein marginales Potential besitzt, seine komplexe Ultrastruktur selbstständig zu regenerieren. Auch wenn sich ein Defekt primär lokal auf das Knorpelgewebe beschränkt, kann er sich im Verlauf progredient zeigen und bei schweren Verletzungen den darunterliegenden Knochen mit betreffen. Culvenor et al. konnten in einer Metastudie zeigen, dass bei 4 – 14% junger Patient:innen (< 40 Jahren) und 19 – 43 % älterer Patienten (> 40 Jahren) in einer Magnetresonanztomographie eines asymptomatischen Knies bereits Zeichen arthrotischer Veränderungen (Knorpelschäden, Meniskuseinrisse, Knochenmarksläsionen und Osteophyten) nachgewiesen werden konnten <sup>[3]</sup>. Daraufhin stellt sich die Frage, welche Folgen sich aus einer Verletzung ohne Symptome entwickeln können und ob Betroffenen von einer unmittelbaren Behandlung profitieren könnten. In einer prospektiven Arbeit von Everhart et al. <sup>[4]</sup> wurden 1.319 Erwachsene Patienten, die einen Knorpelschaden erlitten hatten, über einen Zeitraum von gemittelt 9 Jahren begleitet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der fokale Schaden insbesondere ab einer Größe von  $\geq 2 \text{ cm}^2$  zum Progress neigt und sich als eigenständiger Risikofaktor für eine posttraumatische Arthrose mit folgend

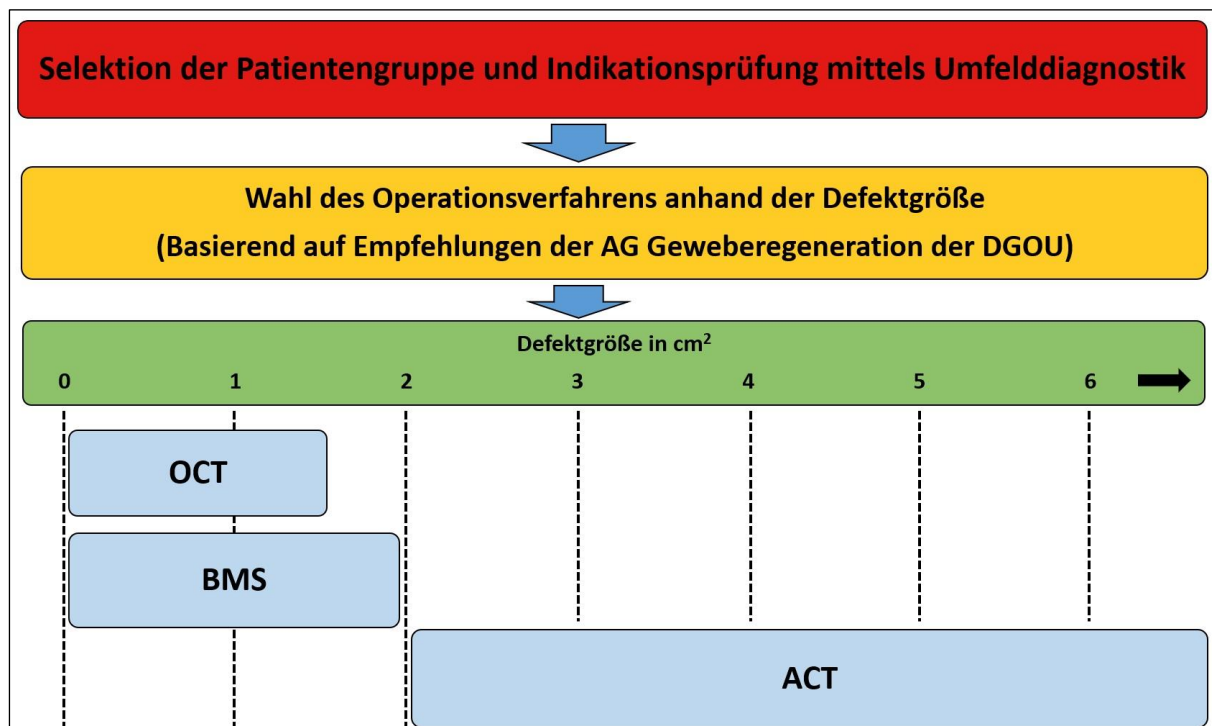
notwendigem Einsatz einer Knie-TEP (Totalendoprothese) (Risiko für TEP unabhängig vom Grad der Osteoarthrose: Hazard Ratio = 5,27 bei Defekten  $\geq 2 \text{ cm}^2$  und Hazard Ratio = 2,65 bei Defekten  $\leq 2 \text{ cm}^2$ ) darstellt. Hinzukommend konnte in einer Publikation von Jungmann et al. eine Reduktion der Gelenkdegeneration durch einen knorpelregenerativen Eingriff belegt werden <sup>[5]</sup>. Dies lässt Grund zur Annahme, dass im Kontext der vorliegenden Klinik eine zügige Behandlung nach Diagnosestellung in Betracht gezogen werden sollte, um ggf. akute Symptome zu lindern und vor allem mögliche Spätfolgen zu reduzieren.

Wichtig ist die fokale Läsion, von der ubiquitären, durch chronische Degeneration verursachten Arthrose abzugrenzen, dessen allgemeine Risikofaktoren zunehmendes Alter, kontinuierliche Überbelastung (bspw. durch Ausübung eines körperlich anspruchsvollen Berufes) und Übergewicht darstellen. Dieses Krankheitsbild soll im Weiteren nicht genauer beschrieben werden.

### **1.3 Grundlagen der klinischen Behandlung des fokalen Knorpelschadens**

Die Therapie des fokalen Knorpelschadens gestaltet sich aufgrund der stark eingeschränkten intrinsischen Regenerationsfähigkeit des Gewebes als durchaus komplex <sup>[6][7]</sup>. Daher ist die Entwicklung einer individuellen Behandlungsstrategie unter Berücksichtigung der ganzheitlichen Klinik und Konstitution der Betroffenen, sowie des Ausmaßes des Defektes eminent wichtig. Dabei sei gesagt, dass folgende Optionen für betroffene Gelenke unter Abwesenheit einer generalisierten, fortgeschrittenen Arthrose (Arthrosegrad  $> 2$  nach Kellgren-Lawrence) gelten. Bei marginalen Schäden mit symptomloser Klinik, kann ggf. auf eine Operation verzichtet und ein konservatives Behandlungskonzept angestrebt werden. Dieses beinhaltet primär eine ausreichende Analgesie und physiotherapeutische Betreuung <sup>[8]</sup>. Liegt jedoch eine symptomatische Verletzung vor, die nach favorisierter Klassifikation der ICRS (International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society <sup>[9]</sup>) mindestens dem Grad III oder höher entspricht, sollten verschiedene operative Verfahren in Erwägung gezogen werden. Die Wahl des Operationsverfahrens sollte basierend auf den evidenzbasierten Empfehlungen der AG Geweberegeneration der DGOU (Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie) getroffen werden (Abb. 2) <sup>[10]</sup>. Grundsätzlich stehen sich knochenmarkstimulierende Methoden und Transplantationsverfahren gegenüber.

Ebenfalls können Medikamente und/ oder viskosupplementierende Medizinprodukte in den betroffenen Gelenkspalt injiziert werden.



**Abbildung 2:** Zusammenfassendes Flussschema für die Auswahl des geeigneten Verfahrens zur biologischen Rekonstruktion isolierter Knorpelschäden des Kniegelenks in Abhängigkeit verschiedener Einflussgrößen. Vereinfachung der Handlungsempfehlungen von Niemeyer et al. <sup>[10]</sup>.  
AG: Arbeitsgemeinschaft, DGOU Deutsche gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie, OCT: Osteochondrale Transplantation, BMS: Bone Marrow Stimulation; ACT: Autologe Chondrozytentransplantation.

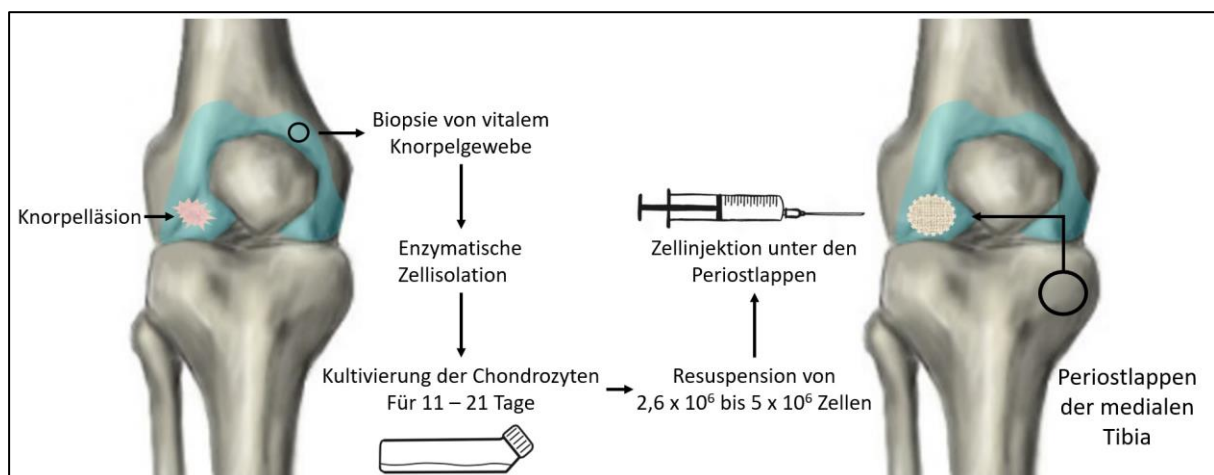
Das Grundprinzip der Knochenmarkstimulation (BMS = Bone marrow stimulation) besteht darin, dass das defekte Knorpelgewebe, meist im Rahmen einer minimalinvasiven Arthroskopie (Gelenkspiegelung), bis auf den subchondralen Knochen abgetragen wird. Folgend werden gezielt Mikrofrakturen mit Hilfe eines Bohrers oder Meißels gesetzt, um eine kontrollierte Einblutung zu generieren. Folglich wandern Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Defekt ein, die eine Reparatur des Knorpels unterstützen sollen. Diese Methode wird jedoch dadurch limitiert, dass nachdem sich primär ein kleines Blutgerinnsel gebildet hat, lediglich ein narbiger Faserknorpel zurückbleibt, welcher im Vergleich zum ursprünglichen hyalinen Knorpel eine deutlich eingeschränkte Druckelastizität aufweist. Studien zeigen, dass kleinere Schäden u.a. am Talus (Sprungbein) durch dieses Verfahren kurz- und mittelfristig durchaus suffizient therapiert werden können. Jedoch fallen langfristig bei der Mehrheit der Untersuchten bereits oberflächliche Defekte auf, welche mit degenerativer Tendenz in fortgeschrittener Osteoarthritis enden können <sup>[11],[12]</sup>.

Der sog. osteochondrale Transfer (OCT, Knochen-Knorpelstanzen Transplantation) findet v. a. Anwendung bei kleinflächigen Verletzungen, die den subchondralen Knochen mitbetreffen. Das Verfahren der OCT ist jedoch im Wesentlichen durch die Entnahmemorbidität limitiert. Bei der operativen Versorgung symptomatischer Defekte mit einer Größe von  $\geq 2 \text{ cm}^2$  mit oder ohne Knochenbeteiligung hat sich vor allem die sog. Autologe Chondrozytentransplantation (ACT; körpereigene Knorpelzelltransplantation) etabliert. Auf die ACT wird im Folgenden genauer eingegangen.

### 1.3.1 Tissue Engineering und Autologe Chondrozytentransplantation

Die ACT ist ein Verfahren, welches auf dem Prinzip des Tissue Engineering beruht. Dabei werden gewebespezifische Produkte aus körpereigenen Zellen (autolog) in vitro hergestellt. Im Bereich der Dermatologie und Plastischen Chirurgie haben sich bereits Rekonstruktionen von Hautarealen, z.B. nach Verbrennungen, etabliert.

Die ACT wurde erstmals 1994 von Herrn Mats Brittberg beschrieben (Abb. 3). Patienten:innen mit einem fokalen Knorpelschaden wurden im Rahmen eines ersten Eingriffs aus einem gesunden, nicht lasttragenden Areal eine Knorpelstanze entnommen. Aus diesen Stanzen wurden in mehreren Schritten Chondrozyten enzymatisch isoliert und über Wochen in vitro vermehrt. In einer zweiten Operation wurde die Läsion debridiert und mit einem Periostlappen übernaht. Anschließend wurde die Knorpelzellsuspension unter den Periostlappen injiziert <sup>[13]</sup>.



**Abbildung 3:** Diagramm einer Chondrozyten Transplantation an der rechten Femurkondyle. Nachempfunden basierend auf der Erstbeschreibung von Brittberg et al. 1994 <sup>[13]</sup>.

Mittlerweile hat sich dieses Verfahren deutlich weiterentwickelt und konnte sich als Goldstandart in der Behandlung größerer Defekten durchsetzen <sup>[14]</sup>. Die Chondrozyten



werden nun bevorzugt matrixassoziiert transplantiert (MACT, Matrixassoziierte Chondrozytentransplantation). Seit der Einführung dieser Technik wurden bis heute verschiedenste Ansätze verfolgt, die auf unterschiedlichen Biomaterialien als Zellträgersysteme basieren <sup>[15]</sup>. Auch wenn die Zusammensetzung der einzelnen Materialienkomponenten unterschiedliche Ansätze verfolgen, die ihr eigenes Für und Wider bieten, sollten sie jedoch in ihrer Essenz dieselben Grundvoraussetzungen erfüllen. Sie müssen biokompatibel sein und sollten somit wenig bis keine Immunreaktion provozieren. Sie sollten die Zellproliferation und Differenzierung durch biochemische und/oder mechanische Reize fördern, sowie Adhäsion, Migration und interzelluläre Interaktionen gewährleisten, um dem funktionellen Phänotyp des Ursprungsgewebes gerecht zu werden. Zudem ist eine hohe Anpassbarkeit zur heterogenen Anwendung wünschenswert. MACT-Produkte der dritten Generation bieten eine dreidimensionale (3D) Trägermatrix, welche zumeist entweder auf einem Hydrogel aus natürlichen Biopolymeren basiert (z.B. Agarose-Alginat, Hyaluronsäure (HA) oder Typ-1-Kollagenen) oder aus makroporösen Gerüsten auf Basis von Kollagenfasern des Typs 1 oder 3, HA, Hyaluronan/Fibrin oder Polyglykolsäure und Poly-(lactic-co-glykol)-säure besteht <sup>[13],[16],[17]</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Wahl des Biomaterials die Zelldifferenzierung und damit letztendlich der Erhalt der Funktionalität erheblich gesteuert werden kann. Durch Modifizierung u. a. der Materialsteifigkeit und damit verbundene Resistenz gegenüber biomechanischer Belastung, der osmotischen Kapazität, des Abbauverhaltens in vivo oder der Matrixretention können an verschiedensten Stellschrauben gewünschte Eigenschaften optimiert werden <sup>[18]–[20]</sup>. Dabei konnte sich jedoch bislang noch kein Biomaterial eindeutig durchsetzen. Obwohl individuelle Vorteile beschrieben werden, sind die bisher einzeln verwendeten Biomaterialien in der Gesamtheit ihrer Eigenschaften limitiert.

Diese Dissertationsschrift soll an dieser Stelle anknüpfen und verfolgt das Ziel, durch eine erstmalige Kombination zweier Biomaterialien, die Vorteile zu summieren und ein möglichst knorpelmimetisches Trägersystem zu entwickeln, um die ACT als Therapie fokaler Knorpelläsionen zu verbessern. Eine Kombination aus zwei Biomaterialien könnte zu einer Verbesserung der chondrogenen Eigenschaften und besonders der Hydroelastik führen. Diese Hybrid-Biomaterialien sollen zum einen aus einem strukturgebenden Fasernetzwerk bestehen, an dem die Zellen adhären werden



können und zum anderen aus einer osmotisch aktiven Phase, welche durch dieses Netzwerk begrenzt ist, um einen Schwelldruck zu erzeugen und schließlich die Knorpelarchitektur und ihre Funktionalität biomimetisch nachbildet. Dabei stellen besonders Seidenfobroin als 3D-Matrix und ein auf HA basierendes Hydrogel als osmotische Komponente eine vielversprechende Kombination dar.

#### 1.4 Seidenfibroin als Biomaterial

Viele verschiedene Insekten und Arachnoiden sind in der Lage Seide in speziellen Drüsen zu produzieren. Schon lange wird Seide in der Textilindustrie für kommerzielle Zwecke verwendet, aber auch in modernster Forschung von Biomaterialien hat Seide stetig an Bedeutung gewonnen. Unter zahlreichen Seidentypen setzte sich aufgrund der methodischen Praktikabilität und Kosteneffizienz die Maulbeerseide durch <sup>[21]</sup>. Maulbeer- oder auch Seidenspinnerraupe (*Bombyx mori*) spinnen sich natürlicher Weise zur Metamorphose in einen Kokon. Dieser besteht zum Großteil aus einem strukturgebenden Kern aus Seidenfibroin (SF) und zu 20 – 30 % aus einer wasserlöslichen Ummantelung aus Seidenserizin (SS) die den SF-Strängen als Ankerpunkt dient <sup>[22]</sup>. SF besteht aus einer schweren (360 – 390 kDa) und einer leichten (27 kDa) Kette, die über Disulfidbrücken und das Glykoprotein P25 verbunden sind <sup>[23]</sup>. SS liegt hauptsächlich als *random coil* Konformation mit einem Molekulargewicht von 20 – 400 kDa vor <sup>[24]</sup>. Lange Zeit hat man die beiden Komponenten durch sog. Degummierung voneinander getrennt. Je nach beabsichtigter Weiterverarbeitung können hierfür verschiedenste Methoden (enzymatisch, mit hoch konzentrierter Urea, saure oder alkalische Puffer, u. w.) angewandt werden <sup>[25],[26]</sup>. Mittlerweile hat sich das Ernteverfahren deutlich weiterentwickelt. So wurde die von uns verwendete Seide anstatt von verpuppten Raupen direkt aus den Sekretionsdrüsen extrahiert. Der Vorteil dieser nativen Seide mit hohem Molekulargewicht (2.3 MDa elementare Einheit) liegt in ihrer erhaltenen Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Diese zeigen durch ihre natürliche Faltung und Fähigkeit zur Selbstassemblierung eine deutlich bessere mechanische Stabilität und Funktionalität im Vergleich zur zuvor beschriebenen, aufbereiteten Seide <sup>[27]</sup>. Ein genauer Ablauf der Methode wird unter „2.1.1 Seidenfibroinmatrix“ beschrieben. Mit dem Fortschritt modernster Verarbeitungstechnologien eröffnen sich neue Möglichkeiten individuelle, 3D-Matrizen herzustellen <sup>[28],[29]</sup>. Aber nicht nur aufgrund ihrer vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, sondern auch durch ihre hohe Zyto-

kompatibilität hat Seide vor allem im Bereich der orthopädischen Chirurgie, mit dem Ziel der Regeneration von Bändern, Bandscheiben und Knochen an Bedeutung gewonnen <sup>[30]–[32]</sup>.

Bisher konnte sich die alleinige Anwendung von Seide jedoch nicht bei knorpelregenerativen Verfahren etablieren. Die architektonische Basis reicht alleine nicht aus, um speziell die Funktion von hyalinem Knorpelgewebe vollständig zu imitieren. Seide bietet den Zellen zwar ein hervorragendes Grundgerüst für adhärentes Wachstum, jedoch kann sie alleine keinen nötigen Schwelldruck erzeugen und bietet somit keine suffiziente mechanische Resistenz bei Belastung.

#### 1.4.1 Hyaluronsäure-Hydrogele als Biomaterial

Hydrogele wurden ursprünglich für ihre minimal-invasive Anwendungsmöglichkeit entwickelt. Besonders Gele, die auf natürlichen Biopolymeren, wie HA basieren, erscheinen aufgrund ihrer chondrogenen und -protektiven Wirkungen vielversprechend <sup>[33],[34]</sup>. HA gehört zu der Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG) und ist Bestandteil von Knorpel- und Bindegewebe im menschlichen Körper. HA liegt in Form von langkettigen, linearen Polysacchariden vor. Genauer besteht die Kette aus repetitiven Disaccharideinheiten aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin (Derivate der Glucose). Aufgrund der Eigenschaft, enorm große Mengen an Wasser in Relation zum Eigengewicht zu binden (bis zu 6 Liter Wasser pro Gramm HA), dient HA zur Aufrechterhaltung von Grundstrukturen in Geweben.

Darüber hinaus kann HA durch das biogene Amin Tyramin und durch Quervernetzungen mittels Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) modifiziert werden <sup>[35]</sup>. Die mechanischen Eigenschaften des entstehenden Hydrogels kann somit durch Variation der HRP- und  $H_2O_2$ -Konzentration beliebig angepasst werden. Diese Methode wurde erst kürzlich in knorpelregenerativen Verfahren eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Belastung eine Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor  $\beta$ 1*), sowie die Synthese sulfatierter GAGs (sGAG) getriggert werden kann <sup>[36]</sup>.

Jedoch ist zu beachten, dass neben den positiven, chondrogenen Effekten auch Nachteile dieses Biomaterials bestehen. Die für die Steifigkeit wichtigen Vernetzungsreagenzien HRP und vor allem  $H_2O_2$  sind höchst zytotoxisch. Daher beinhaltet diese Arbeit einen Versuchsteil, um die Konzentrationen der Reagenzien zu

ermitteln, mit denen ein möglichst mechanoresilientes Gel erzeugt werden kann, aber gleichzeitig die Vitalität der eingebetteten Zellen nicht nachhaltig einschränkt wird.

#### 1.4.2 Fragestellung

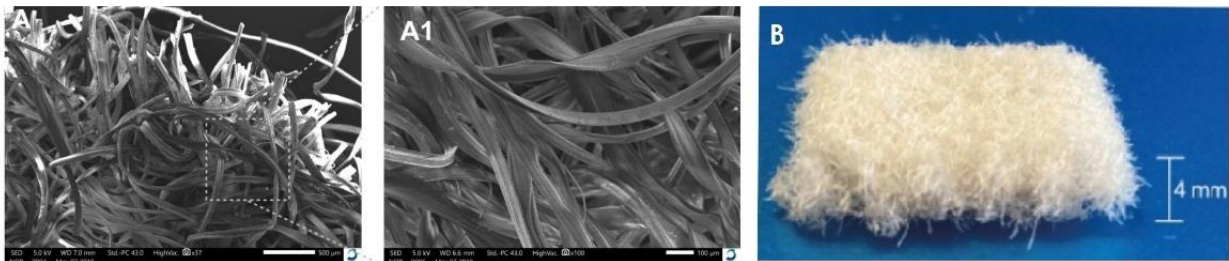
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Behandlung von defektem Knorpelgewebe aufgrund seiner eingeschränkten Regenerationsfähigkeit als durchaus komplex erweist. Jedoch ist die Erhaltung von dessen Funktion insbesondere für die Prävention von Langzeitschäden eminent wichtig. Die ACT bildet hierbei die führende Technik, größere Läsionen zu therapieren. Nichtsdestotrotz zeigen die klinischen Daten, dass eine Weiterentwicklung des Verfahrens dringend benötigt wird. Bei der Wahl der Biomaterialien herrscht in aktueller Forschung noch keine Einigkeit. Es wird postuliert, dass mit Hilfe von Seidenfibroin in Form von dreidimensionalen Matrices und einem HA-Hydrogel ein hochmodifizierbares Hybrid-Trägersystem erzeugt werden kann, welches zum einen die chondrogene Entwicklung positiv beeinflusst und zum anderen die natürliche Architektur und Funktionalität des Knorpelgewebes suffizient nachbilden kann. Einzelne konnten die beiden Biomaterialien in vitro bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen. Das Ziel dieser Dissertationsschrift ist es, mit Hilfe einer aussagekräftigen Quantifizierung zu prüfen, ob eine Kombination zu einer Summierung der positiven Effekte führt und sich humane Chondrozyten mit hoher Zytokompatibilität auf dem kombinierten Trägersystem kultivieren lassen. Dazu sollen die Vitalität, Proliferation, Differenzierung, EZM-Synthese und Biomechanik untersucht und evaluiert werden. Des Weiteren soll der Einfluss des etablierten Standard Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zur alleinigen Verwendung der Biomaterialien geprüft werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Biomaterialien

#### 2.1.1 Seidenfibroinmatrix

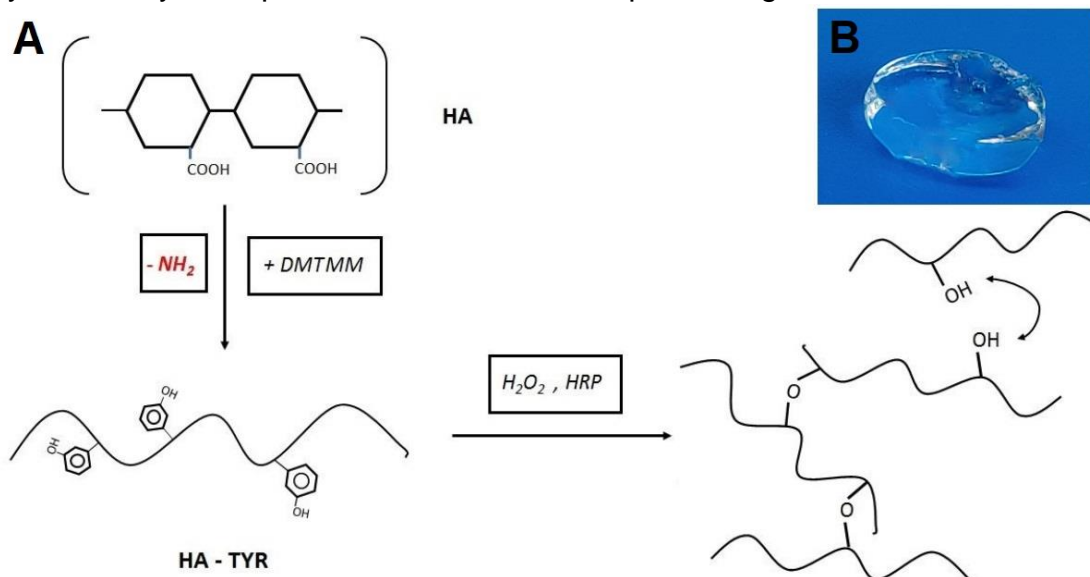
Die in dieser Arbeit verwendete Seidenfibroinmatrix (SM) wurde an der Technischen Universität Dresden im Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik produziert. Steril gehaltene, domestizierte Maulbeerspinnerraupe synthetisieren Seide in speziellen Drüsen. Zur Gewinnung der Seide wurde zunächst eine Pufferlösung mit 100 mM Tris in einem Becken vorgelegt. Je nach Weiterverarbeitung kann der Puffer beliebig angepasst werden und zudem weitere Lösungen wie beispielsweise therapeutisch aktive Substanzen oder Färbreagenzien hinzugegeben werden, um die Seide wie gewünscht zu modifizieren. Nun wurden die Larven sezirt und die Drüsen extrahiert. Die epitheliale Zellwand wurde anschließend durch einen mechanischen Schnitt (alternativ auch durch Ultraschall oder enzymatisch) eröffnet. Mit einer speziellen Halteapparatur werden die Drüsen automatisiert mit Hilfe von Aufnahme- und Transferarmen perlschnurartig über dem Puffer platziert und die Inzisionsstelle eingetaucht. Eine manuelle Bestückung ist ebenfalls möglich. Die Seide löst sich nun aus der Drüse heraus und fließt im Pufferbecken zu einem Sammelbereich. Optional kann die Seide durch Filter mit verschiedensten Porengrößen aufbereitet werden, um eine bessere Homogenität der Proteinstränge zu erzeugen und Verunreinigungen herauszufiltern [27]. Das native Seidenfibroinextrakt für diese Arbeit wurde direkt gesponnen. Anschließend wurden etwa 1,5 g Seidenfasern für je 200 cm<sup>2</sup> durch Nadelpunktionen verdichtet, entlang der Mittellinie einmal gefaltet und erneut genadelt, sodass ein nicht-gewobenes scheibenförmiges Seidenfibroin-Scaffold entstand (Abb. 4).



**Abbildung 4:** REM-Aufnahmen eines Seidenscaffolds (A): Heterogene Architektur der 3-dimensionalen Seidenfibroinscaffolds. Faserdicke etwa 50 - 100 µm. Maßstab A: 500 µm; A1: 100 µm. Rohvorlage einer Seidenfibroinmatrix (B).

### 2.1.2 Hyaluronsäure-Tyramin-Hydrogel

In dieser Arbeit verwendeten wir ein osmotisch aktives Hydrogel des AO Research Institute Davos, Schweiz. Das Gel basiert auf Tyramin-modifizierter Hyaluronsäure, welche mittels HRP und  $H_2O_2$  miteinander chemisch verknüpft werden. Die HA stammt von *Streptococcus equi* (Contipro Biotech S.R.O.) und besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 280 kDa. Als Grundvoraussetzung für die Herstellung dieses mechanoresilienten Hydrogels müssen die HA-Stränge untereinander quervernetzbar gemacht werden. Für diese Modifikation wurde zunächst die Carboxylgruppe der D-Glucuronsäure, als eine der Basiseinheiten der HA, durch DMTMM (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride; TDI) gezielt aktiviert und Tyramin, ein biogenes Amin, unter Abspaltung einer Aminogruppe kovalent gebunden <sup>[35]</sup>. Bei dieser Reaktion wird jedoch nur ein Teil der vorhandenen Carboxylgruppen aktiviert, sodass ein molarer Substitutionsgrad des Tyramins von ca. 6 DS<sub>mol</sub> in % entsteht. Dieser Grad beschreibt wie viele Mol Tyramin im Durchschnitt an die HA-Einheiten gebunden wurden. Die vorliegenden Hyaluronsäure-Tyramin (HA-Tyr) Ketten wurden nun durch sog. *crosslinking* mit Hilfe einer HRP und  $H_2O_2$  über Wasserstoffbrückenbindungen quervernetzt, sodass eine gelantineartige Konsistenz entstand. Die Viskosität des Gels kann durch Modulation der  $H_2O_2$ - und HRP-Konzentration gezielt gesteuert werden und erlauben eine dynamische Individualisierung. Im Rahmen dieser Arbeit führten wir rheologische Messungen und Analysen der Zytokompatibilität zur Biomaterialoptimierung durch.



**Abbildung 5:** Schematischer Ablauf der Hydrogelmodifikation und Vernetzung.  $NH_2$  = Aminogruppe; DMTMM = 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride; HA-TYR = Tyramin versetzte Hyaluronsäure;  $H_2O_2$  = Wasserstoffperoxid; HRP = Meerrettichperoxidase (A). Geliertes Hyaluronsäure-Hydrogel (B) Durchmesser etwa 8 mm, Höhe etwa 3 mm.

## 2.2 Kulturmedien und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Chondropermissives Kulturmedium	HG-DMEM 1 % ITS Liquid Media Supplement (ITS) 0,1 mM MEM-NEAA 50 µg/ml Vitamin C 10.000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycinsulfat
DMMB-Lösung	16 mg DMMB in 10 ml absolutem Ethanol 2,37 g NaCl 3,04 g Glycin 85 ml 0,1M HCL 895 Aqua dest PH: 3,0
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAN Biotech, Aidenbach, Germany)	1,0 g/l Glukose L-Glutamine Sodium Pyruvat 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM; PAN Biotech, Aidenbach, Germany)	4,5 g/l Glukose L-Glutamin Sodium Pyruvat 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
Kulturmedium	HG-DMEM 10% Sera Plus 0,1 mM MEM-NEAA 10.000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycinsulfat 50 µg/ml Vitamin C 2 ng/ml FGF-2
Paraformaldehyd Lösung	PBS 0,1 % (v/v) NaOH 4 % (w/v) Paraformaldehyd
PBE-Stammlösung	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,01 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 6,5

Tris Pufferlösung (Tris buffered saline; TBS)	0,1 M HCL 9 % NaCl pH 7,5
Toluidin-Färbelösung	0,0714 % (w/v) Toluidin-Blau 0,0714 % (w/v) Pyronin G 0,143 % (w/v) Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Borax Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )

## 2.3 Gebrauchsfertige Kits

Produkt	Hersteller
Celltiter-Blue-Assay	Promega, USA
cDNA Synthese Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
DNA quantification kit	Promega, Mannheim, Germany
dNTP-Mix (10 nM)	Qiagen, Hilden, Germany
QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden, Germany
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermofisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Germany
RQ1 RNase-Free DNase-Kit	Promega, USA
TaqMan® Universal PCR Master-Mix	Thermofisher Scientific, USA
1,9-Dimethylmethylenblau-(DMMB)-Assays	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany

## 2.4 Enzyme

Produkt	Hersteller
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Pronase	Roche, Mannheim, Germany
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Germany
Trypsin-EDTA	Lonza, Köln, Germany
Typ-2-Kollagenase	Worthington, Lakewood, USA



## 2.5 Antikörper

Produkt	Spezies	Bindung	Hersteller
Anti-type-II-collagen antibody (monoclonal)	Maus	Primär	CIIC 1, DSHB, Iowa, USA
Anti-Maus-IgG (mit HRP konjugiert)	Kaninchen	Sekundär	Dako, Dänemark
Anti-Kaninchen-IgG (mit HRP konjugiert)	Ziege	Tertiär	Dako, Dänemark

## 2.6 Chemische Substanzen und Lösungen

Produkt	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aquatex	Merck, Darmstadt, Germany
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Calcein-AM (Fluorexon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
DePex	Merck, Darmstadt, Germany
Diaminobenzidin	Biochrom AG, Darmstadt, Germany
DNase I	Quiagen, Hilden, Germany
Dulbecco's modified Eagle's medium	Biochrom AG, Darmstadt, Germany
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Darmstadt, Germany
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Ethidium-Homodimer-1	Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland
Fibroblastic growth factor-2 (FGF-2)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
ITS Liquid Media Supplement (ITS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Mayer's Hämalaun Lösung	Roth, Karlsruhe, Germany
Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
β-Merkaptoethanol	Quiagen, Hilden, Germany
Methanol	Roth, Karlsruhe, Germany



Non-essential Amino Acid Solution (MEM-NEAA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Osmium	Pasel und Lorei GmbH, Frankfurt, Germany
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Germany
Paraplast (Paraffin)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Penicillin G	PAA Laboratories, Pasching, Germany
Propanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany
Random Hexamer Primer	Thermofisher Scientific, USA
RDD-Puffer	Quiagen, Hilden, Germany
5x Reaction Buffer	Thermofisher Scientific, USA
RLT Lysisbuffer	Quiagen, Hilden, Germany
RPE-Puffer	Quiagen, Hilden, Germany
RQ1 DNase	Promega, USA
RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer	Promega, USA
RQ1 DNase Stop Solution	Merck, Darmstadt, Germany
RW1-Puffer	Quiagen, Hilden, Germany
Special processed fetal bovine serum (Sera plus)	PAN-Biotech, Aidenbach, Germany
Stickstoff	Air Liquid, Düsseldorf, Germany
Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Germany
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Staufen, Germany
Transforming growth factor $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Toluidin-Blau	In vitrogen, USA
Vitamin-C	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
Xylol	Roth, Karlsruhe, Germany

## 2.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Realtime rtPCR System	Applied Biosystems, USA
ABI Prism 7000	Applied Biosystems, USA

ApoTom	Zeiss, Wetzlar, Germany
AxioCam Mrm	Zeiss, Wetzlar, Germany
Axiophot	Zeiss, Wetzlar, Germany
Axioskop	Zeiss, Wetzlar, Germany
Axiovert 200M	Zeiss, Wetzlar, Germany
Brutschrank Typ BB 6220	Heraeus, Hanau, Germany
Centrifuge 5415 R	Sarstedt, Nürmbrecht, Germany
Centrifuge 5430	Sarstedt, Nürmbrecht, Germany
Critical Point Dryer 030	Balzers, Schalksmühle, Germany
F-2000 Fluoreszenzspektrometer	Hitachi, Japan
Flourometer, TECAN reader	Tecan, Männedorf, Switzerland
Gefrierschrank (-80 °C und -20 °C)	Heraeus, Hanau, Germany
iCycler, Thermocycler	Biorad, USA
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Konfokalmikroskop, LSM 510	Zeiss, Wetzlar, Germany
Kryostat, 2800 E Frigocut	Reichert-Jung, Depew, USA
Materialprüfmaschine, Instron 5866	Instron Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany
Mikrotom ,RM 2165'	Leica, Wetzlar, Germany
Modular Compact Rheometer (MCR 302)	Anton Paar, Graz, Austria
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Germany
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo, Gießen, Germany
Pipetten, Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipette, Direktverdrängungspipette, Microman 100 – 1000 µl	Gilson, France
Rotationsmischer, Stuart SB2	Merck, Darmstadt, Germany
Sterilbank, HERAsafe	Heraeus, Hanau, Germany
Thermocycler, primus 96'	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany
Transmissionselektronenmikroskop, JSM-IT 200	JEOL GmbH, Freising, Germany
Ultrospec IIE – Photometer	LKB Biochrom, Cambridge UK

Vakuum-Zentrifuge VR-1	Intermed, Geesthacht, Germany
Vortexer REAX 2000	Omnilab, Leipzig, Germany
Waage	Sautorius, Göttingen, Germany
Wärmeplatte	MEDAX Nagel, Kiel, Germany
Wasserbad	MEDAX Nagel, Kiel, Germany

## 2.8 Verbrauchsgegenstände

Produkt	Hersteller
6-Well-Platte	Starstedt, Newton, USA
12-Well-Platte	Greiner, Leipzig, Germany
96-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Adhäsions-Objektträger	Mariefeld, Lauda-Königshofen, Germany
Biopsiestanze 6 mm	Hebu, Tuttlingen, Germany
CryoPure Gefäß 1,6 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Cutfix Stainless Einmalskalpell	Aesculap, Tuttlingen, Germany
Hautstanze 6 mm	Hebu, Tuttlingen, Germany
Objektträger	Mariefeld, Lauda-Königshofen, Germany
Pipettenspitzen 1000 µl & 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen 25 ml & 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Skalpellklingen	Bayha, Tuttlingen, Germany
Spritzenfilter 0,2µm Porengröße	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
T-300-Zellkulturflaschen (300 cm <sup>2</sup> )	Starstedt, Nümbrecht, Germany

## 2.9 Computersoftware

Produkt	Hersteller
Axiovision 4.7	Carl Zeiss, Göttingen, Germany
Image J	Wayne Rasband, NIH, USA
Realtime rtPCR: ABI Prism 7000 ±S	Applied Biosystems, USA
Statistik: Graph Pad Prism 5	Graph Pad Software Inc., USA

### 3 Methoden

#### 3.1 Isolierung humaner Chondrozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Chondrozyten (hCh; menschliche Knorpelzellen) stammen aus Knorpelgewebe von operativ entfernten Femurköpfen (Oberschenkelkopf). Diese wurden im Rahmen einer Hüft-TEP in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel steril entnommen und anschließend enzymatisch isoliert. Die Patienten/innen (n = 6; Alter:  $63 \pm 5,8$  Jahre) wurden zuvor ausführlich über das Vorhaben aufgeklärt und willigten schriftlich ein. Ein Votum der Kieler Ethikkommission lag vor Versuchsbeginn vor (AZ D558/19; 05. Dezember 2019). Nach der Entnahme wurden die Hüftköpfe in das Zellkulturlabor gebracht und in einem ersten Schritt mit *phosphate buffered saline* (PBS; Sigma-Aldrich, Buchs, Swtizerland) + 10 % Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (P/S; PAA Laboratories, Pasching, Germany) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der hyaline Gelenkknorpel mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt und in einem mit PBS + 10% P/S gefüllten Schraubglas gesammelt. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass der hyaline Gelenkknorpel nur aus makroskopisch intakten Arealen entnommen und kein subchondrales Knochengewebe mit abgetragen wurde. Der resezierte Knorpel wurde in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Fragmente zerschnitten und zweimal in je 50 ml PBS + 10% P/S für 15 min gewaschen.

Anschließend erfolgte ein zweistufiger enzymatischer Verdau in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Biochrom, Berlin, Germany) zunächst mit 0,1 % Pronase (Roche, Mannheim, Germany), für 2 h bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub>. Pronase ist eine Suspension aus mehreren nicht-spezifischen Endo- und Exoproteasen, welche in der Lage sind die meisten Proteine so weit zu verdauen, dass lediglich einzelne Aminosäuren vorliegen. Nach erneutem Waschen mit PBS + 10% P/S wurden die Knorpelfragmente in *high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium* (HG-DMEM, Biochrom, Germany) durch eine Typ-2-Kollagenase (600 U/ml; Worthington, Lakewood, USA), für 14 h in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C final verdaut. Bei diesem Prozess wurden die Kollagenfasern des Knorpelgewebes vollständig aufgelöst, sodass die hCh isoliert vorlagen. Unverdaute Gewebereste wurden, durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 40 µm von der Zellsuspension getrennt. Anschließend wurden die Proben bei 565 x g für 7 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet zweimalig in DMEM mit 10 % *special processed fetal bovine serum* (Sera plus; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany)

gewaschen und letztendlich in einem definierten Volumen in HG-DMEM resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### 3.2 Kultivierung und Passagierung humaner Chondrozyten

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die hCh in T-300-Zellkulturflaschen (Fläche: 300 cm<sup>2</sup>) mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> als Monolayerkultur ausgesät und bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (P0). Die Zellexpansion fand in jeweils 50 ml HG-DMEM mit 10 % Sera Plus, 1 % P/S, 1 % Vitamin-C (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1% *Eagle's minimum essential medium, non-essential Amino Acid Solution* (0,1 mM MEM-NEAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 2 ng/ml *fibroblastic growth factor-2* (FGF-2; R&D Systems, Minneapolis, USA) statt.

Es wurde die Zellproliferation täglich lichtmikroskopisch begutachtet und alle 3 bis 4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Sobald eine etwa 70 %ige Konfluenz der Flaschenböden vorlag, wurden die hCh passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium nahezu restlos aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurde 10 ml Trypsin-EDTA (Lonza, Köln, Germany) hinzugegeben, um die bestehenden Adhäsionskontakte der hCh vom Flaschenboden zu lösen, sodass die Zellen in Lösung gingen. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen wurden jeweils 20 ml HG-DMEM + 10 % Sera Plus hinzugegeben. Nach Zentrifugation bei 565 x g für 7 min wurden die Zellen resuspendiert, Zellzahl bestimmt und die Zellen erneut mit einer Dichte von 10.000 Zellen/ cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach zwei Zellpassagen (P2) wurden die hCh für die weitere In-vitro-Kultivierung geerntet.

### 3.3 Vorbereitung der Aussaat und Biomaterialien

Zunächst wurden Kammerböden einer 24-Well-Platte mit steriler 2 %iger Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichtet. Dies verhindert die Bildung einer Monolayerkultur in den 24-Well-Platten während der weiteren Kultivierung.

Die Seidenmatrizen wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze (Durchmesser: 6 mm, Höhe: 3mm) auf einheitliche Größen gestanzt, anschließend mittels 70 %igem, unvergelltem Ethanol sterilisiert, mindestens fünfmal mit PBS gewaschen und zuletzt unter UV-Licht steril getrocknet.

Das HA-Tyr Hydrogel wurde wie folgt präpariert. Für eine Massenkonzentration von 3,5 % (weight/volume) wurden 35 g des HA-Tyr-Pulvers abgewogen, in je ein 2-ml-Eppendorfcup überführt und mit geöffnetem Deckel für mindestens 30 min mit UV-Licht sterilisiert. Anschließend wurde das Pulver in je 973,3 µl PBS gelöst und 10 µl

HRP mit 1,0 U/ml hinzu pipettiert. Nun wurden die Proben für mindestens 4 h bei 4 °C in einem Rotationsmischer vermischt, um eine ausreichende Homogenisierung zu gewährleisten. Damit war die Gelbasis hergestellt.

### 3.4 Aussaat der Chondrozyten in die Seidenmatrizen und das Hydrogel

Für eine aussagekräftige Verifizierung unserer Hypothese, dass sich die Kombination zweier Biomaterialien, im Vergleich zum einfachen Trägersystem, vorteilhaft auf die chondrogene Entwicklung auswirkt und gleichzeitiger Testung des Einflusses des etablierten Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1, stellten wir folgende Versuchsgruppen auf (Tab.1).

Versuchsgruppen	Biomaterialien
1.	Seidenfibroinmatrix
2.	Seidenfibroinmatrix + TGF- $\beta$ 1
3.	Seidenfibroinmatrix + Hyaluronsäure-Tyramin Hydrogel
4.	Seidenfibroinmatrix + Hyaluronsäure-Tyramin Hydrogel + TGF- $\beta$ 1
5.	Monolayerkultur (als Kontrollgruppe in der PCR)

**Tabelle 1:** Übersicht der Versuchsgruppen.

Für die Beimpfung wurden die zuvor aufbereiteten SM-Scaffolds (s. 2.2.4) in sterile Eppendorfcup-Deckel gelegt. Die in Monolayerkulturen expandierten hCh wurden in ihrer zweiten Zellpassage (P2) mittels Trypsin-EDTA aus ihren Zellkulturflaschen gelöst und gezählt.

Die hCh wurden mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  hCh/cm<sup>2</sup> SM ausgesät. Bei einer Fläche der SM-Stanze von 0,283 cm<sup>2</sup> wurden  $0,7075 \times 10^6$  hCh in 50  $\mu$ l HG-DMEM + 10 % Sera Plus + 1 % Vitamin C + 1 % P/S + 1% MEM-NEAA auf ein SM-Scaffold gegeben. Diese wurden für 2 h im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um den Zellen eine Adhäsion an den Matrizes zu ermöglichen. Die Proben der SM-Gruppen waren damit fertig beimpft.

Die Proben der Kombinationsgruppen wurden wie folgt weiter behandelt. Auf die beimpften SM-Scaffolds in den Eppendorfcupdeckeln wurde zusätzlich je 150  $\mu$ l der bereits mit HRP versetzten HA-Tyr-Suspension pipettiert. Um nun das *crosslinking* zu katalysieren und somit die gewünschte Primärsteifigkeit zu erreichen wurde anschließend jeweils 2,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) hinzugegeben, mit

einer finalen Konzentration von 0,6 mM <sup>[36]</sup>. Nach etwa 5 - 15 min waren die Gele vollständig ausgehärtet.



**Abbildung 6:** Seidenfibroin-HA-Tyr-Hydrogel Hybridscaffold. Durchmesser etwa 8 mm, Höhe etwa 4 mm.

### 3.5 Kultivierung der beimpften Biomaterialien

Nach der Aussaat der Zellen in die Biomaterialien wurden die Proben aus den Eppendorfcupdeckeln entnommen und jeweils zwei Trägersysteme derselben Gruppe in eine Vertiefung der bereits mit Agarose beschichteten 24-Well-Platte (s. 2.2.4) gegeben. Pro Well wurden 1 ml chondropermissives Kulturmedium (HG-DMEM + 1 % P/S + 1 % Vitamin C + 0,1 mM MEM-NEAA + 1 % ITS Liquid Media Supplement (ITS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugegeben.

Zusätzlich zu dem Vergleich zwischen der SM- und der SMHA-Gruppe wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 untersucht. Dafür wurde den dafür vorgesehene Gruppen 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems, Minneapolis, USA) hinzugefügt.

Alle Gruppen wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt.

### 3.6 Optimierung des Hydrogels

#### 3.6.1 Rheologische Untersuchung des HA-Tyr-Hydrogels unter variierender Zellzahl und Konzentration der Vernetzungsreagenzien

Die Rheologie oder auch Fließkunde ist die Wissenschaft die das Fließ- und Verformungsverhalten von Materialien untersucht. Um den Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften des Hydrogels unter An- bzw. Abwesenheit von hCh, sowie unter angepassten Konzentrationen der Vernetzungsreagenzien HRP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu analysieren, führten wir rheologische Messungen mit einem Anton Paar *Modular Compact Rheometer* (MCR, Abb. 7) mit 25 mm Parallelplattensystem (CP-25-1, Anton Paar, Graz, Austria) durch.





**Abbildung 7:** Anton Paar Modular Compact Rheometer zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele unter variierender Zellzahl an hCh und Konzentrationen der Vernetzungsreagenzien HRP und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Alle Messungen wurden bei  $20^\circ\text{C}$  durchgeführt, kontrolliert durch eine Peltier-Temperatursteuereinheit, und mit einem Probenmessspalt von  $0,2\text{ mm}$ . Oszillatorische Tests (Amplituden- und Zeit-Sweep) wurden für jede Probe durchgeführt. Das Speichermodul ( $G'$ ) wurde bei einer Dehnung (strain) von  $1\%$  gemessen, die innerhalb des linearen viskoelastischen Bereichs lag.  $G'$  beschreibt die Energie, die in einer Probe gespeichert wird nachdem eine definierte Kraft auf diese ausgeübt wurde und die nach Entlastung erneut aus der Probe gewonnen werden kann.

Um den Einfluss von Zellen auf die viskoelastischen Eigenschaften von HA-Tyr zu untersuchen, wurden zellfreie und zellbeladene Hydrogele ( $n = 6$ ; jedes mit 3 technischen Replikaten) mit unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $50 - 1200\text{ }\mu\text{mol}$ ) und HRP ( $0,5$  und  $1\text{ U/ml}$ ) Konzentrationen hergestellt. Jede Probe wurde dann mit einem Gesamtvolumen von  $0,5\text{ ml}$  vorbereitet. Zur Herstellung von zellbeladenen Hydrogelen wurden hCh unter Verwendung von Trypsin-EDTA geerntet. Eine Endkonzentration von  $2,5 \times 10^6\text{ Zellen/ml}$  wurde in  $50\text{ }\mu\text{L}$  PBS resuspendiert, welches von der hydratisierten HA-Tyr-Lösung abgezogen wurde. Nach einer Homogenisierung des Hydrogels über Nacht wurde die Zellsuspension in der hydratisierten HA-Tyr-Lösung spiralförmig injiziert, um eine homogene Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Die



Gelierung der Hydrogele von zellfreien und zellbeladenen Gelen wurde dann durch Zugabe von unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (50 - 1200  $\mu\text{mol}$ ) eingeleitet. Jede Probe wurde direkt auf der Messplatte des Rheometers vorbereitet. Um die homogene Verteilung von Vernetzungsmitteln sicherzustellen, wurden die Proben kurz geschüttelt und dann gemessen.

### 3.6.2 Bestimmung des Zytokompatibilitätsbereiches im Hydrogel mittels CellTiter-Blue-Assay

Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und HRP als wichtiger Bestandteile des HA-Tyr-Hydrogels, wurde ein Zytokompatibilitätsbereich mit Hilfe eines CellTiter-blue-Assays (CTB-Assay) bestimmt. Es musste eine Balance gefunden werden, in der zum einen ausreichend vitale hCh persistieren und gleichzeitig eine gewünschte Primärsteifigkeit durch genügend *crosslinking* erreicht werden konnte.

Das Prinzip des CTB-Assay beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität einer Zellpopulation. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff Resazurin enzymatisch zu Resorufin umzuwandeln. Daraus lässt sich ableiten: Je größer und vitaler die Zellpopulation, desto mehr Farbstoff kann umgewandelt werden. Die Quantität dieser Indikatorreaktion kann aufgrund unterschiedlicher Extinktionsmaxima des Reaktanten und Produktes in Form eines Fluoreszenzsignals mit einem Fluorometer gemessen werden.

Für die Bestimmung des Zytokompatibilitätsbereiches wurden Ansätze mit variierenden Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 - 1200  $\mu\text{mol}$ ) und HRP (0,1 - 1 U/ml) mit hCh aus Monolayerkulturen erstellt. Nach 24 und 96 h Inkubationszeit in chondropermissivem Medium, bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$ , wurde ein CTB-Assay durchgeführt. Dazu wurde in einer 24-Well-Platte in je eine Vertiefung für jede Versuchsgruppe 300  $\mu\text{l}$  HG-DMEM pipettiert und anschließend 60  $\mu\text{l}$  CellTiter-blue-Reagenz hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h im Brutschrank bei 37 °C bei einer Atmosphäre von 5 %  $\text{CO}_2$ . Mit Hilfe des Fluorometers (Tecan, Männedorf, Switzerland) wurde folgend die *relative fluorescence unit* (RFU) bei 560 nm<sub>Ex</sub> und 590 nm<sub>Em</sub> gemessen. Für jede Versuchsgruppe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der gemessene Leerwert (HG-DMEM + CellTiter-Blue-Reagenz) wurde dabei von den gemessenen RFUs subtrahiert.

### 3.7 Bestimmung der Zellvitalität mittels Live/ Dead-Färbung

Bei der Live/Dead-(L/D)-Färbung können vitale von abgestorbenen Zellen mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen visualisiert werden. Das zum einen verwendete Calcein-AM (oder auch Fluorexon; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wird von lebenden Zellen aufgenommen und folgend durch intrazelluläre Esterasen aktiviert. Dies führt zu einer sichtbar werdenden, grünen Fluoreszenz unter einem Konfokalmikroskop (*Laser Scanning Microscope*) mit einem Extinktionsmaximum bei 494 nm. Zum anderen wurde ein Ethidium-Homodimer-1 (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) verwendet, welcher nur durch geschädigte Zellmembranen nach intrazellulär gelangen kann. Dort bindet er an Nukleinsäuren, welche folgend unter einem Konfokalmikroskop als rote Fluoreszenz mit Extinktionsmaxima bei 300 und 520 nm sichtbar werden.

An Tag 1, 7 und 28 nach Beimpfung wurde eine L/D-Färbung der SM- und SMHA-Gruppen durchgeführt. Nachdem das Kulturmedium abgenommen und die Proben zweimal in PBS gewaschen wurden, wurde zu jeder Versuchsgruppe 10  $\mu$ M Calcein-AM und 5  $\mu$ M Ethidium-Homodimer-1 in 1 ml HG-DMEM hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h im Brutschrank bei 37 °C bei einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub>. Die Proben wurden anschließend mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Germany) untersucht. Um die vitalen und nicht-vitalen Zellen zu quantifizieren wurden je drei Aufnahmen von drei repräsentativen Sichtfeldern und mit einem Minimum von 100 Zellen, mit Hilfe der Software Image J (Wayne Rasband, NIH, USA) gezählt.

### 3.8 Zellmorphologie und Scaffoldarchitektur im Rasterelektronenmikroskop

Um die Zellmorphologie und Scaffoldarchitektur zu analysieren wurden die SM-Proben nach 72 h in Kultur über Nacht bei 4°C in 3 % Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)/ PBS inkubiert, folgend für 60 min mit 2 % Osmium (OsO<sub>4</sub>; Pasel und Lorei GmbH, Frankfurt, Germany) bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die Proben wurden getrocknet (Critical Point Drying; Balzers, Critical Point Dryer 030, Schalksmühle, Germany), aufgesetzt, mit Gold besputtert (Ion Tech LTD, Teddington, UK) und in Aufsicht mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskop, JSM-IT 200 (JEOL GmbH, Freising, Germany) digitalisiert.

### 3.9 Analyse der Knorpelzelldifferenzierung mittels Echtzeit Reversetranskriptase Polymerase-Kettenreaktion

Das Ziel der Echtzeit Reversetranskriptase Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-qPCR) ist der Vergleich der Expressionsrate spezifischer Gene der hCh in den

unterschiedlichen Gruppen, um eine Aussage über den Grad der Zelldifferenzierung treffen zu können. Dafür wurden die Knorpelzellen zunächst lysiert und die gesamte *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) isoliert. Danach wurden die mRNA-Stränge in ihre *complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben, da nur DNA-Sequenzen in einer PCR amplifiziert und quantifiziert werden können. Dies wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase erreicht. Die erhaltenen cDNA-Sequenzen werden durch Zielgen spezifische Primer in einer gewöhnlichen PCR kloniert. Für den letztendlichen qPCR-Ansatz wird nun zusätzlich ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben. Dieser ist in der Lage die neu entstandenen DNA-Doppelstränge, zu binden und ein in „Echtzeit“ detektierbares Signal zu imitieren.

Die Quantifizierung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt. Diese beruht auf dem Wissen, dass sog. housekeeping Gene unabhängig vom Zelltyp, der Zellreife und den extrazellulären Gegebenheiten, stetig mit etwa derselben Expressionsrate abgelesen werden. Durch diese Gene werden vornehmlich essenzielle Zellfunktionen aufrechterhalten. Typischerweise kodieren sie für Strukturmoleküle und Enzyme des Grundstoffwechsels. Anhand der Konzentration der komplementären mRNA im Zytoplasma kann somit eine Basisexpressionsrate bestimmt werden. Normalisiert man die Expressionsraten der zu untersuchenden Gene, auf die des housekeeping Gens und vergleicht diese mit einer Kontrollgruppe, ergibt sich daraus die jeweilige relative Genexpressionsrate, welche erlaubt, Rückschlüsse auf den Grad der Differenzierung zu schließen. Die erhobenen Werte wurden jeweils auf die SM-Gruppe als Kalibrator bezogen.

### 3.9.1 Zielgene

Für diese Arbeit wurde das für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) kodierende Gen als housekeeping Gen ausgewählt. GAPDH ist ein Enzym welches eine zentrale Rolle im Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel darstellt.

Zur Beurteilung der Differenzierung wurden die für Kollagen Typ I, -II, -X (COL1A1; COL2A1; COL10A1), Aggrecan (ACAN) und *SRY-box transcription factor 9* (SOX-9) kodierende mRNA analysiert. Kollagen II und ACAN sind wie in Absatz 1.2 bereits beschrieben, essentielle Bestandteile der im hyalinen Knorpelgewebe enthaltenen EZM und stellen somit einen wichtigen Marker für die Ausprägung des funktionellen Phänotyps dar. Das Protein SOX-9 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher von sich

proliferierenden, nicht hypertrophen hCh gebildet wird und spielt eine eminente Rolle bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knorpelzellen.

Kollagen Typ I ist ein Protein welches meist dickere Fasern bildet und einen wesentlichen Bestandteil von u.a. Haut, Sehnen, Bändern und Knochen darstellt. Natürlicher weise kommt es nur zu einem geringen Anteil im hyalinen Knorpel vor. Synthetisieren die aus dem hyalinen Knorpel isolierten Zellen vermehrt Kollagen I spricht dies für eine Dedifferenzierung.

Kollagen X ist ein netzförmiges Protein welches vor allem in der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge (Wachstumsplatte) im Knochen vorkommt. Es wird dort von hypertrophen Chondrozyten gebildet und stellt somit einen weiteren Marker für den Verlust der ursprünglichen Funktion dar.

### 3.9.2 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA verwendeten wir in dieser Arbeit das RNeasy Kit von Qiagen (Hilden, Germany). Hierbei wird die mRNA aufgrund ihrer negativen Ladung kovalent an eine Silikamembran gebunden und mittels Säulenzentrifugationstechnik aufbereitet.

Die RNA-Expression wurde nach 24 h und 28 Tagen analysiert. SMHA-Proben wurden zunächst in einem Kryostat unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 700 µl RLT Lysispuffer (Qiagen, Hilden, Germany) + 1 % β-Merkaptoethanol (Qiagen, Hilden, Germany) gelöst. Die Proben der SM-Gruppe wurden direkt in jeweils 350 µl RLT Lysispuffer + 1 % β-Merkaptoethanol gegeben.

Um die RNA von groben Zellmatrix- und Biomaterialresten zu trennen, wurden die Proben auf eine Qias shredder-Säule (Qiagen, Hilden, Germany) gegeben und bei 16.100 x g für 2 min zentrifugiert. Die Säulen wurden daraufhin verworfen und dem entstandenen Lysat dieselbe Menge an bereits vorliegender Suspension (700 µl bei den SMHA-Proben und 350 µl bei den SM-Proben) an 70%igem Ethanol hinzugegeben, um diese zu waschen. Die gesamte Suspension wurde dann auf eine RNeasy-spin-coloumn (Qiagen, Hilden, Germany) gegeben, welche die Silikamembran enthält. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 x g für 30 s zentrifugiert. Die gewünschte mRNA und ebenfalls enthaltene DNA liegen nun auf der Membran gebunden vor. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und 10 µl DNase I (Qiagen, Hilden, Germany) + 70 µl RDD-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) zentral auf die Membran der Säule gegeben, um die DNA-Reste zu verdauen. Nach

15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgen mehrere Reinigungsschritte. Zunächst wurden 700 µl RW1-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) auf jede Säule gegeben und diese bei 8.000 x g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zweimal je 500 µl RPE-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) hinzugegeben und bei 8.000 x g zuerst für 15 s und beim zweiten Mal für 2 min zentrifugiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16.100 x g für 1 min, um die Proben zu trocknen, liegt schließlich die mRNA isoliert und gebunden vor. Um diese zu ernten wurde die Säule auf ein 2-ml-collection-tube überführt, 50 µl RNase freies Wasser mittig auf die Membran gegeben und bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die mRNA liegt nun gelöst im collection-tube vor.

Zuletzt wurde die Konzentration in [ng/µl] photometrisch bestimmt. Dabei wurde eine potentielle Nukleinsäurenkontamination mittel Spektralphotometrie ausgeschlossen. Bei einem Quotienten der optischen Dichte (OD)<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> von 2,0 wurde eine reine RNA-Lösung angenommen. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### 3.9.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des RevertAid RT Reverse Transcription Kit von Thermofisher Scientific (alle Reagenzien: Waltham, USA) durchgeführt. Der Ansatz für die cDNA-Synthese bei RNA-Mengen von 0,5 – 1 µg/ml besteht pro Reaktion aus der reversen Transkriptase mit 200 U im Verhältnis von 1:4 mit 5X Reaction Buffer verdünnt, aus einem 2 mM dNTP Mix, aus 100 pmol Random Hexamer Primer und aus RNase freiem H<sub>2</sub>O, um die Suspension pro Reaktion auf insgesamt 20 µl aufzufüllen. Die fertigen Lösungen wurden dann in einen Thermocycler (iCycler, Biorad, USA) gegeben. Hier erfolgte die cDNA-Synthese in den drei Schritten Inkubation (10 min bei 25 °C), reverse Transkription (50 min bei 42 °C) und Denaturierung (10 min bei 70 °C). Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 3.9.4 Realtime-qPCR

Für die Realtime-qPCR wurde mit Qiagen QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) gearbeitet. In einem Ansatz für eine Reaktion wurden 12,5 µl SYBR Green MasterMix (Qiagen, Hilden, Germany), 0,3 µM *sense* (Biomers, Ulm, Germany), 0,3 µM *antisense* (Biomers, Ulm, Germany) des spezifischen Primers (Tab. 2) und 40 ng cDNA pipettiert. Diese Lösung wurde mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf insgesamt 25 µl aufgefüllt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung angesetzt. Diese wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert und mit einem 7500 Fast Real-Time

PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mit jeweils 40 Zyklen nach folgendem Schema gemessen: 50 °C für 30 min, 95 °C für 15 min und anschließend 40 Zyklen 94 °C für 15 s (Denaturierung), 60 °C für 30 s (*annealing*), spezifische Primer-Schmelztemperatur für 30 s (*extending*). Folgende Primer (alle Biomers, Ulm, Germany) wurden gemessen:

Primer (human)	Sequenz	Schmelztemperatur [°C]
GAPDH sense	GCCTCAAGATCATCAGCAATGC	75
GAPDH antisense	TGGTCATGAGTCCTTCCACGAT	
Aggrecan sense	GAGGCCAGCAGAGAAGATTCTG	77
Aggrecan antisense	GACGCCTCGCCTTCTTGAA	
Kollagen 2A1 sense	CAACACTGCCAACGTCCAGAT	77
Kollagen 2A1 antisense	CTGCTTCGTCCAGATAGGCAAT	
SOX 9 sense	CTCGGAGACTTCTGAACGAGAG	81
SOX 9 antisense	CGTTCTTCACCGACTTCCTCC	
Kollagen 1A1 sense	AATTCCAAGGCCAAGAAGCATG	78,5
Kollagen 1A1 antisense	GGTAGCCATTTCTTGGTGGTT	
Kollagen 10A1 sense	CCCTTTTTGCTGCTAGTATCCTTGA	74
Kollagen 10A1 antisense	AACTGTGTCTTGGTGTGGGTAGTG	

**Tabelle 2:** Humane *sense* und *antisense* Primersequenzen

### 3.10 1,9-Dimethylmethylenblau-Assay zur Analyse der Glykosaminoglykane

Ziel des 1,9-Dimethylmethylenblau-(DMMB)-Assays (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) ist eine Quantifizierung der von den hCh gebildeten sulfatierten GAGs (sGAGs), als Indikator der EZM-Neosynthese. Die Analyse fand 28 Tagen nach Beimpfung statt und wurde sowohl in den Biomaterialien selber, als auch im kumulativ gesammelten Zellmedium bestimmt. Das bei jedem Wechsel abgenommene Medium wurde hierzu bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

Wenn der Farbstoff DMMB an sGAGs bindet, führt dies zu einer metachromatischen Reaktion. Die dadurch entstehende Veränderung des Absorptionsspektrums kann photometrisch gemessen und quantifiziert werden.

Die Biomaterialproben wurden zunächst in einem Kryostat unter Zugabe von Flüssigem Stickstoff gemörstert und anschließend in 1 ml deionisiertem Wasser für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Verdauung in jeweils 3 mg/ml Proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany) je Probe für 48 h bei 56 °C. Proteinase K ist ein Enzym, welches Peptidbindungen von Proteinen sowohl von außen als Exo-, als auch von innen als Endopeptidase relativ unspezifisch spaltet.



Die kumulativen Mediumproben benötigten keine weitere Behandlung und konnten direkt gemessen werden. Der verwendete Standard setzt sich aus Chondroitinsulfat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) und PBE-Puffer (Konzentrationen: 6,25 µg/ml – 200 µg/ml) zusammen. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit DMMB-Lösung (pH = 3,5) verdünnt und anschließend als Dreifachbestimmung mit Hilfe eines Photometers (TECAN Reader) bei einem Absorptionsmaximum von 525 nm gemessen.

### 3.11 DNA-Quantifizierung

Um eine Aussage über die GAG-Synthese pro Zellzahl treffen zu können, müssen die GAG-Konzentrationen [µg/ml] in den Biomaterialien bzw. im Medium auf den DNA-Gehalt der zugehörigen Gruppe normalisiert werden. Das Prinzip des hierfür verwendeten DNA-Quantifizierungs Kit (Promega, Mannheim, Germany) beruht auf der Bindung von BisBenzimid H33258 (Hoechst 33258) an der AT-Sequenz der DNA-Doppelstränge. Diese Bindung führt zur Freisetzung eines Fluoreszenzsignals, welches photometrisch quantifiziert werden kann.

Für die Vorbereitung wurde eine BisBenzimid-(H33258)-Lösung mit 0,2 µg/ml angesetzt und der 10X Fluorescence Assay Buffer (Promega, Mannheim, Germany) im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Der Standard des Kit (1 mg/ml Kälberthymus-DNA (10 mM Tris HCl, mM EDTA, pH 7,4); Konzentrationen: 10 ng/ml – 500 ng/ml) wurde 1:100 mit deionisiertem Wasser + 10 % 10X Fluorescence Assay Buffer verdünnt. Folgend wurden die Standardreihe und jeweils 10 µl Probenvolumen (jeweils als Dreifachbestimmung) auf einer 96-Well-Platte vorgelegt. Erst kurz vor der Messung wurden 200 µl der photosensiblen BisBenzimid-Lösung unter lichtarmen Bedingungen in jedes vorgelegte Well pipettiert. Die Fluoreszenz wurde in einem TECAN Fluoreszenz-Reader bei 360 nm<sub>Ex</sub> und 460 nm<sub>Em</sub> gemessen.

### 3.12 Histologie

Für weitere Aufschlüsse über die Zellmorphologie und EZM-Synthese wurden die Proben beider Gruppen nach 28 Tagen Kultivierung histologisch aufgearbeitet. Mit Hilfe einer Toluidin-Blaufärbung kann die Konzentration von sGAGs, als ein Marker für die EZM-Neosynthese, visualisiert werden. Ebenfalls wurden Typ II Kollagene immunhistochemisch gefärbt. Die Proben wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Germany) begutachtet und repräsentative Bildausschnitte miteinander verglichen.

### 3.12.1 Toluidin-Blaufärbung

Toluidin-Blau ist ein azidophiler Farbstoff, der selektiv saure Gewebekomponenten, wie sGAGs färbt, sodass eine Metachromasie von blau zu violett erfolgt. Dabei ist die Intensität der Färbung proportional zu der enthaltenen sGAG-Konzentration.

Die Proben für die Toluidin-Blaufärbung wurden mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek, Staufen, Germany) eingebettet und bei -20 °C gefroren. Anschließend wurden die Proben unter einem Kryostat sagittal in 50 µm dicke Gewebeschnitte top-to-bottom geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Danach wurden die Schnitte für jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %iger; 96 %iger; 90 %iger; 80 %iger; 70 %iger und 60 %iger Ethanol) behandelt und für 1 h in einem Trockenschrank getrocknet. Folgend wurden die Proben für 10 min in 70 %igem, vergälltem Ethanol gegeben. Nach vorsichtigem Abspülen mit Aqua dest. folgte die Färbung mit Toluidin-Blau-Färbelösung für 5 min. Nach einem weiteren Waschvorgang mit Aqua dest., um überschüssige Farbe abzuspuhlen, wurden die Proben mit 96%igem Ethanol behandelt. Zuletzt wurden die Schnitte je dreimal für 3 min in 98%igem Propanol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) und anschließend dreimal für 5 min in Xylol (Roth, Karlsruhe, Germany) gegeben. Die fertig gefärbten Proben wurden abschließend mit Eindeckmedium DePeX (Merck, Darmstadt, Germany) gedeckelt und untersucht.

### 3.12.2 Immunhistochemie Kollagen Typ 2

Zur immunhistologischen Untersuchung wurden bebrütete Trägersysteme beider Gruppen, sowie eine zellfreie Kontrollgruppe mit kombinierten Biomaterialien für 10 min in 4 %igem Paraformaldehyd (Roth, Germany; in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in 2 %iger Agarose eingebettet und in Form eines kleinen Würfels aus der Agarose herausgeschnitten. Die Agaroseblöcke mit den eingeschlossenen Proben wurden mit PBS gründlich gewaschen. Es folgte eine Dehydration in aufsteigender Ethanolreihe, Behandlung in Xylol und schließlich Einbettung in Paraplast (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Mittels Schlittenmikrotom (Leitz, Wetzlar, Germany) wurden 7 mm dicke Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger gegeben.

Anschließend erfolgte eine Deparaffinierung mit Xylol, absteigender Ethanolreihe und letztendlich Spülung mit destilliertem Wasser. Folgend wurden die Proben mit Pepsin (3.9 kU/ml 0,5% acetic acid; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) behandelt und mit



Tris Pufferlösung (TBS; pH 7,5) gespült. Unspezifische Peroxidasen werden durch die Behandlung mit 0,6 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol für 20 min inaktiviert und anschließend dreimalig mit TBS gewaschen. Der Primärantikörper für Kollagen 2 (Maus, Anti Typ-II-Kollagen Antikörper; ClIC1, DSHB, Iowa, USA) wurden im Verhältnis von 1 : 1.000 in TBS verdünnt und jeweils für 1 h aufgetragen. Nach erneutem dreimaligem waschen mit TRIS-NaCl wurde der Sekundärantikörper (Kaninchen, Anti-Maus-IgG, Dako, Dänemark; 1:200 in TBS) für 30 min hinzugegeben. Nach einem letzten dreimaligen Waschdurchgang wurde der finale Tertiärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen-IgG mit HRP konjugiert; 1:100 in TBS) für 30 min aufgegeben. Abschließend folgte eine Färbung mit Diaminobenzidin (Biochrom AG, Darmstadt, Germany), welches mit der HRP des Tertiärantikörpers chromogen reagiert und zu einer Braunfärbung führt. Es lässt sich also zurückschließen, dass je höher die Konzentration an Kollagen II ist, desto intensiver ist die lichtmikroskopisch zu sehende Färbung.

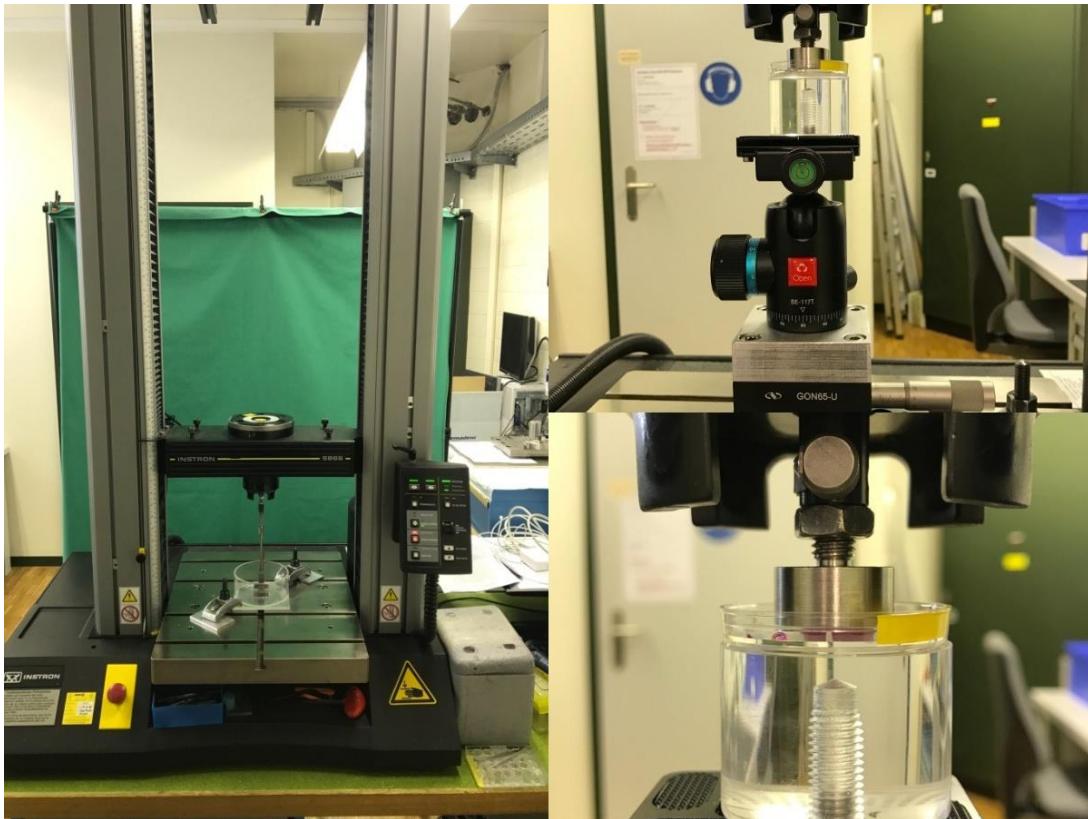
Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Meyer's Hämalaun (Roth, Karlsruhe, Germany) angefertigt. Dieser Farbstoff bindet basophile Strukturen, insbesondere Nuklei bzw. darin enthaltene DNA (sowie das raue endoplasmatische Retikulum) und färbt diese blau. Die gefärbten Proben wurden schließlich in Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany) eingebettet. Das durchgeführte Vorgehen beruht auf einer in der Arbeitsgruppe etablierten Technik <sup>[37],[38]</sup>.

### 3.13 Biomechanische Untersuchung

Die biomechanischen 1-Stufen-Kompressionsversuche zur Ermittlung der Probensteifigkeit wurden in einer Materialprüfmaschine (Instron 5866, Norwood, USA) durchgeführt, die mit einer 10 N Lastzelle („load cell“) ausgestattet war (Abb. 8). Die initiale Probenhöhe  $h_0$  wurde für jede Probe individuell nach 24 h mit einer digitalen Schieblehre gemessen und die Proben in eine mit HG-DMEM gefüllte Zellkulturschale gegeben.

Für den Kompressionstest wurden die Proben durch einen Druckstempel mit flacher Oberfläche (0,02 N Vorlast) mit einer Kompressionsgeschwindigkeit von 0,5 mm/min belastet, bis eine Kompression von 30 % der Ausgangshöhe  $h_0$  erreicht wurde. Mit Hilfe der erhaltenen Daten ( $n = 6$ ) aus dem anfänglich linearen Teil der Spannungs-Dehnungs-Kurve wurde das Elastizitätsmodul (Young'sches Modul) berechnet.

Die Spannungsrelaxationszeit  $t_{(1/2)}$  wurde als die Zeit quantifiziert, in welcher der im Kompressionstest gemessene Peak der Widerstandskraft ( $P_{\max}$ ) bei 20 %  $h_0$  auf die Hälfte dieses Wertes abgefallen war (steady state).



**Abbildung 8:** Kompressionstest zur Ermittlung der Gewebeelastizität (Young's Modulus) mittels Instron 5866 Materialprüfmaschine. Hierzu wurden die Proben in einer unbegrenzten (uncontained) Prüfkammer installiert und mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2 mm/min bis zu 30 % der Ausgangshöhe der Probe komprimiert. Die Versuche wurden mit einer Instron 5866 Prüfapparatur und einer 10 N Lastzelle durchgeführt.

### 3.14 Statistik

Alle Daten wurden unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalität geprüft. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Eine One-way-ANOVA-Analyse mit Mehrfachvergleich nach Bonferroni wurde verwendet, um die Mittelwerte zwischen den unabhängigen Versuchsgruppen zu vergleichen. Das Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt. Quantitative Daten im Text werden als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dargestellt.

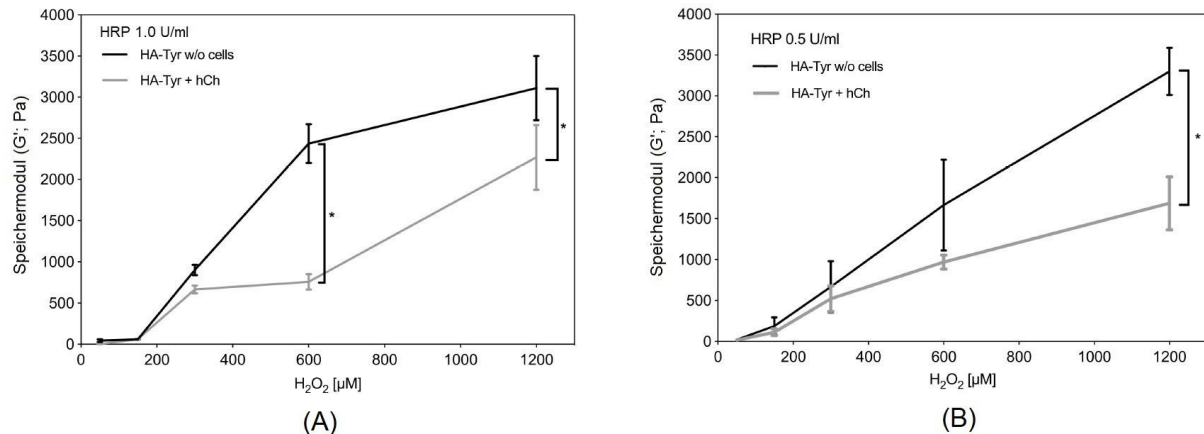
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Viskoelastische Eigenschaften des HA-Tyr-Hydrogels unter variierender Zellzahl und Konzentration der Vernetzungsreagenzien

Die rheologische Untersuchung des HA-Tyr-Hydrogels wurde bei zellularisierten, sowie zellfreien Gelen ( $2,5 \times 10^6$  hCh/ml) unter variierender Aktivitäten von HRP (0,5 und 1,0 U/ml) und Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 – 1200  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt und  $G'$  bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bis 1200  $\mu\text{M}$  auch das Speichermodul anstieg (0,5 U/ml HRP und 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zellen:  $1665 \pm 784,89$  Pa; 0,5 U/ml HRP und 1200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zellen:  $3300 \pm 410,12$  Pa; 1,0 U/ml HRP und 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zellen:  $2435 \pm 332,34$  Pa; 1,0 U/ml HRP und 1200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zellen:  $3110 \pm 675,35$  Pa; Abb. 9).

Im Vergleich zeigten die HA-Tyr-Hydrogele mit hCh ein signifikant geringeres  $G'$  (1,0 U/ml HRP und 1200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zellen:  $3110 \pm 675,35$  Pa; 1,0 U/ml HRP und 1200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Zellen:  $2266,67 \pm 680,69$  Pa;  $p = 0,0244$ ; Abb. 9 b).

Die Konzentration von HRP hatte lediglich einen geringen Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften. Eine höhere Konzentration führte jedoch zu einer schnelleren Gelierung des Gels (Daten nicht aufgeführt).

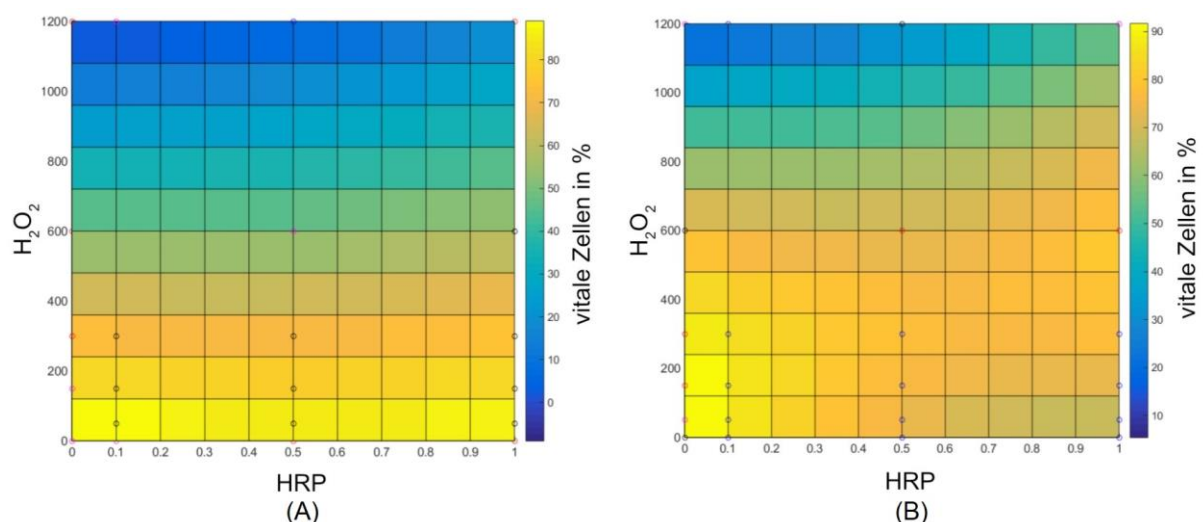


**Abbildung 9:** Viskoelastische Eigenschaften des HA-Tyr-Hydrogels unter An- bzw. Abwesenheit von Zellen und Konzentration der Vernetzungsreagenzien  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 – 1200  $\mu\text{M}$ ) und HRP (0,5 und 1 U/ml). Rheologische Messungen wurden direkt nach Versteifung des Gels mit (A) 1,0 U/ml HRP und (B) 0,5 U/ml HRP und ohne bzw. mit Beimpfung von  $2,5 \times 10^6$  hCh/ml durchgeführt. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind durch ein „\*“-Symbol gekennzeichnet. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD aufgeführt ( $n = 6$ ).

## 4.2 Bestimmung des Zytokompatibilitätsbereichs von HA-Tyr-Vernetzungsmitteln

Mit Hilfe der rheologischen Untersuchung (siehe oben) konnten gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  eminent wichtig ist, um eine hohe Primärsteifigkeit zu erreichen. Jedoch musste aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der Vernetzungsreagenzien ein Zytokompatibilitätsbereich mittels unterschiedlicher Konzentrationen von HRP (0,1 – 1 U/ml) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 – 1200  $\mu\text{M}$ ) ermittelt werden. Hierfür wurde ein CTB-Assay nach 24 und 96 h durchgeführt.

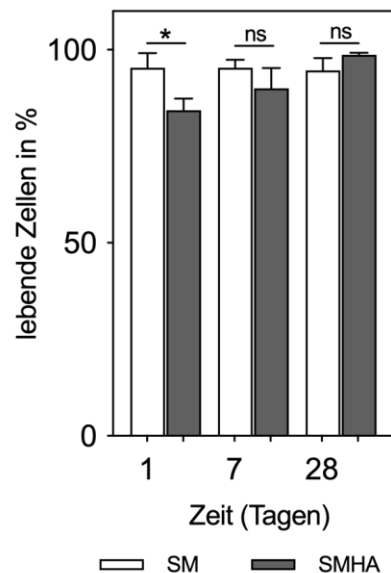
Eine Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration beeinflusst die metabolische Aktivität von Monolayer-hCh signifikant, wobei dieser Effekt durch eine gleichzeitige Erhöhung der HRP-Konzentration gemildert werden konnte (Abb. 10). Insbesondere im Bereich hoher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (>1000  $\mu\text{M}$ ) führte 1,0 U/ml HRP zu einer deutlichen Steigerung der metabolischen Zellaktivität (0,5 U/ml HRP und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $12 \pm 2,3\%$ ; 1,0 U/ml HRP und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $37 \pm 6,32\%$ ). Darüber hinaus zeigte die Zellaktivität, dass sich hCh in Gegenwart von > 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zeitabhängig, wie nach 96 h zu sehen, erholten. Dieser Effekt zeigte sich bei einer Aktivität von 1,0 U/ml HRP am deutlichsten (0,5 U/ml HRP und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $49 \pm 4,25\%$ ; 1,0 U/ml HRP und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $68 \pm 5,78\%$ ; Abb. 10 b). Aufgrund der Erkenntnisse aus dieser Untersuchung und der rheologischen Messungen wurde das HA-Tyr-Hydrogel für die Hybridscaffolds mit jeweils 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 1,0 U/ml HRP angesetzt.



**Abbildung 10:** Metabolische Aktivität der hCh in Abhängigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - (50 – 1200  $\mu\text{M}$ ) und HRP-Konzentration (0,1 – 1,0 U/ml) in Monolayerkulturen. Die Metabolische Aktivität wurde mittels CellTiter-Blue Assay in einer 2-dimensionalen Monolayerkultur ( $n = 4$ ) nach 24 h (A) und nach 96 h (B) bestimmt. Die Aktivität in Prozent wurde mit Hilfe einer unbehandelten Kontrollgruppe (= 100 %) normalisiert und zu einer 2-polynormalen Funktionsgleichung, mittels MATLAB r2014 (Bestimmtheitsmaß  $R^2 \geq 0,7$ ), umgewandelt.

### 4.3 Zellvitalität und -morphologie in 3D Kultur

Die Zellvitalität und -morphologie wurde mit Hilfe einer L/D-Färbung (Abb. 11, 12) und Rasterelektronenmikroskopie (REM, Abb. 13) nach 1, 7 und 28 Tag/en beurteilt. In der SM-Gruppe konnte eine stabil bleibende Vitalität mit einem Mittelwert von 95,11 % lebenden hCh über die gesamten 28 Tage detektiert werden. Im Vergleich zeigte die SMHA-Gruppe initial ein signifikant geringeres Überleben (SM 1 d vs. SMHA 1 d:  $p = 0,0245$ ) mit  $84,33 \pm 3,1$  % vitalen Zellen. Jedoch erholten sich die Zellen im Verlauf der 7 Tage auf ein Niveau von  $90,00 \pm 5,3$  % und stiegen weiter bis auf  $>98$  % nach 28 Tagen an (SMHA 1 d vs. SMHA 28 d:  $p = 0,0382$ ), sodass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen festgestellt werden konnte (SM 28 d vs. SMHA 28 d:  $p = > 0,9999$ ) (Abb. 11). TGF- $\beta$ 1 zeigte keinen Einfluss auf die Zellvitalität (Daten nicht aufgeführt).



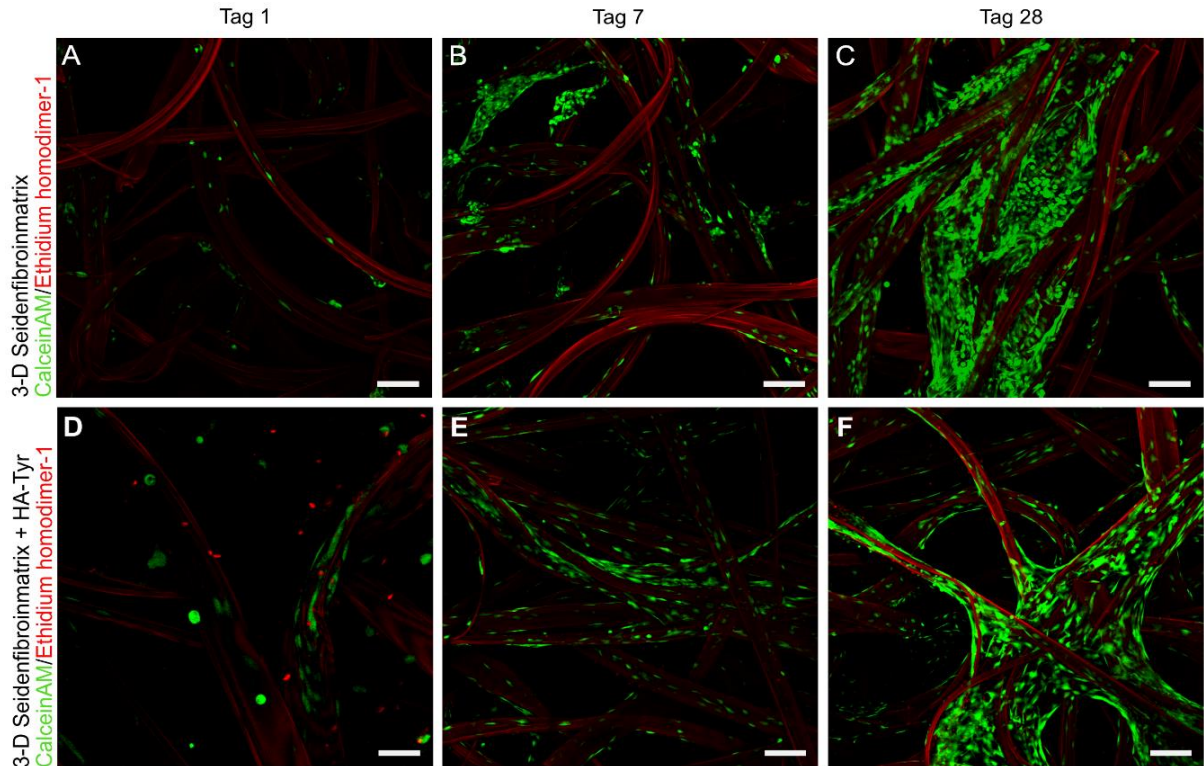
**Abbildung 11:** Quantifizierung der Zellviabilität. Quantifizierung der lebenden Zellen in Prozent zu den total ausgesäten hCh der SM- und SMHA-Gruppe nach 1, 7 und 28 Tag/en in Kultur. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind durch ein „\*“-Symbol gekennzeichnet, ns = not significant. Die Daten sind als Mittelwerte + SD aufgeführt ( $n = 3$ ).

Über den Beobachtungszeitraum zeigten die hCh in der L/D-Färbung eine deutliche Adhäsion und Zellproliferation entlang der Fibroinfasern in allen Gruppen (Abb. 12). Dabei nahmen die Zellen eine ramifizierte Morphologie an. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht erhoben werden. In den SMHA-Gruppen konnte lediglich eine geringe Zellmigration in das Hydrogel beobachtet werden.

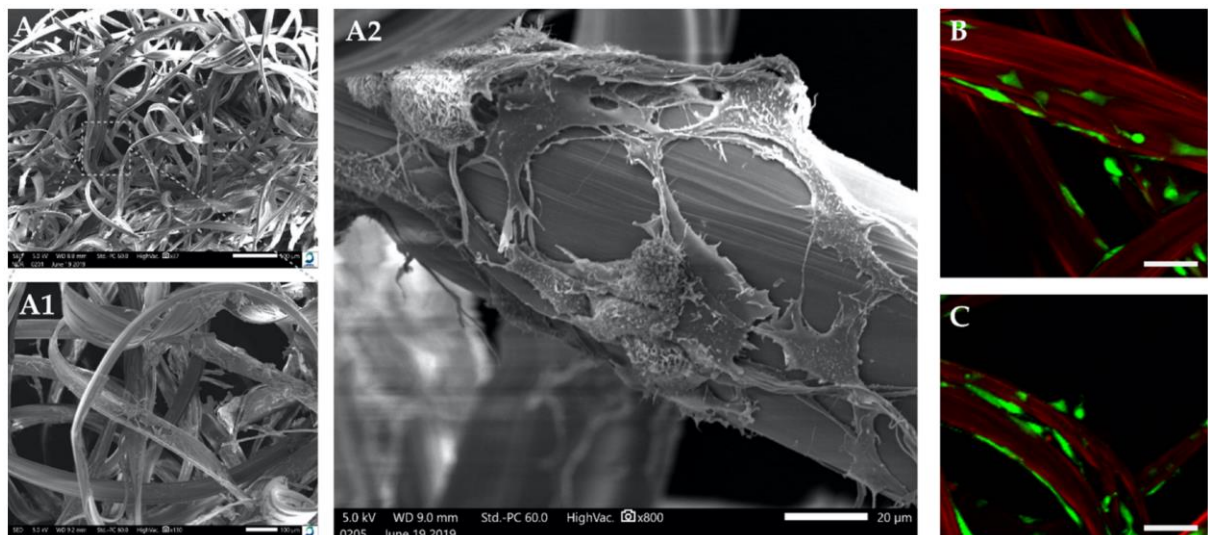
Im REM sichtbar, schmiegt sich die hCh flach, ähnlich wie in einer Monolayerkultur an die Seidenfasern an. Zytomorphologisch nahmen die Zellen dabei einen verzweigten fibroblastenartigen Phänotyp an (Abb. 13, A bis A2). Auch hier zeigte sich



in der L/D-Färbung kein wesentlicher Unterschied im Gruppenvergleich. Die Anwesenheit von HA scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie und Proliferation zu haben (Abb. 13 B, C).



**Abbildung 12:** Live/Dead-Färbung. **A - F:** Repräsentative Bildausschnitte mit Darstellung von proliferierenden, vitalen (grün) bzw. apoptotischen (rot) hCh nach 1, 7 und 28 Tag/en in Kultur. Aufgrund von Autofluoreszenz ebenfalls rot zu sehen sind Seidenfibroinfasern **A - C:** hCh der SM-Gruppe. **D - F:** hCh der SMHA-Gruppe. Maßstab 150  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 13:** REM-Aufnahmen der SM-Gruppe (**A**): Heterogene Architektur der 3-dimensionalen Seidenfibroinscaffolds (Maßstab 500 $\mu\text{m}$ ). Faserdicke etwa 50 - 100  $\mu\text{m}$  (**A1**, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ ). Die hCh zeigen einen fibroblastenartigen Phänotyp nach 3 Tagen Kultivierung (**A2**, Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ). L/D-Färbung der SM-Gruppe (**B**) und der SMHA-Gruppe (**C**). Knorpelzellen zeigen einen ramifizierten Phänotyp in beiden Gruppen. Maßstab (B, C) 25  $\mu\text{m}$ .

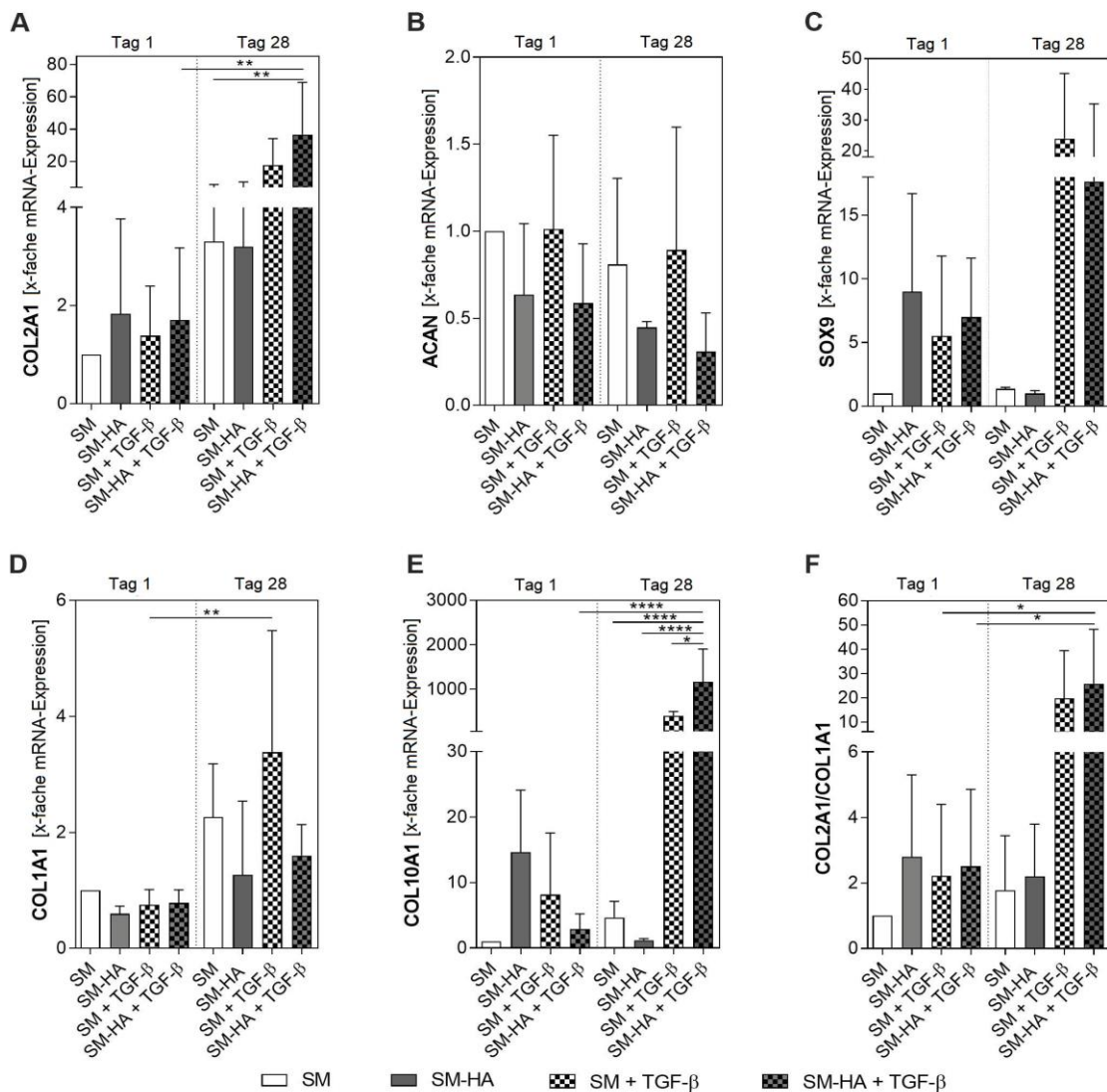
#### 4.4 Chondrogene Zelldifferenzierung

Die chondrogene Zelldifferenzierung wurde mittels qPCR untersucht. Dabei wurden zum einen chondrogene Marker (COL2A1, ACAN, SOX9) bestimmt, die eine regelrechte Differenzierung implizieren und zum anderen Dedifferenzierungs- (COL1A1) und Hypertrophiemarker (COL10A1), welche für eine mangelnde Zellentwicklung sprechen. Es wurden Proben nach 1 und 28 Tag/en untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 geprüft.

Im Verlauf des Versuchs konnte in allen Gruppen ein Anstieg der relativen Genexpression von COL2A1 festgestellt werden (Abb. 14, A). Am stärksten ausgeprägt zeigte sich der Effekt in der SMHA + TGF- $\beta$ 1-Gruppe mit signifikantem Ergebnis (mRNA Expression von COL2A1 in SMHA + TGF- $\beta$ 1 1 d vs. SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d:  $p = 0,0018$ ). An Tag 1 zeigte sich in der SMHA-Gruppe eine nicht signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur SM-Gruppe. Die Proben mit TGF- $\beta$ 1 präsentierten nach einem Tag ein ähnliches Bild. Darüber hinaus zeigte sich an Tag 28 eine signifikant höhere relative Expression in der SMHA + TGF- $\beta$ 1-Gruppe im Vergleich zur SM- (mRNA Expression von COL2A1 in SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d vs. SM 28 d:  $p = 0.0016$ ) und SMHA-Gruppe (mRNA Expression von COL2A1 in SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d vs. SMHA 28 d:  $p = 0,0030$ ). Bei der relativen ACAN-Expression (Abb. 14, B) konnten keine signifikanten Veränderungen gemessen werden. Jedoch ließ sich über den Untersuchungszeitraum eine absteigende Tendenz in allen Gruppen erkennen. Im Vergleich exprimierten die SM-Gruppen mit oder ohne Wachstumsfaktor gering mehr mRNA, als die korrespondierenden SMHA-Gruppen. TGF- $\beta$ 1 zeigte höchstens einen marginalen Einfluss. Die Analyse der relativen Expression von SOX9 (Abb. 14, C) ergab keine signifikanten Varianzen, jedoch konnte vor allem in den TGF- $\beta$ 1-Gruppen eine erhöhte Expression nach 28 d gemessen werden. In der SMHA-Gruppe wurde nach initial höherer Expression im Vergleich zur SM-Gruppe nach 28 Tagen nur noch eine geringe Menge SOX9 exprimiert. Die relative Expression des Dedifferenzierungsmarkers COL1A1 ließ sich durch das HA-Tyr Hydrogel, trotz marginaler Hochregulation im Verlauf, positiv beeinflussen (Abb. 14, D). Befanden sich an Tag 1 noch alle Gruppen auf einem ähnlichen Niveau, zeigten die SM-Gruppen zum Versuchsende einen Anstieg der Expression, wobei dieser unter Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 signifikant war (mRNA Expression von COL1A1 in SM + TGF- $\beta$ 1 1d vs. SM + TGF- $\beta$ 1 28 d:  $p = 0,0015$ ). Das Markergen der Chondrozytenhypertrophie COL10A1 (Abb.14, E) zeigte in den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Gruppen nach 28 Tagen

im Vergleich zu Tag 1 eine erhöhte relative Expression, wobei die Zunahme in der SMHA+TGF- $\beta$ 1-Gruppe signifikant war (mRNA Expression von COL10A1 in SMHA + TGF- $\beta$ 1 1 d vs. SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d:  $p < 0,0001$ ). Jedoch konnte in der Kombinationsgruppe SMHA im Vergleich zur SM-Gruppe eine deduktive Tendenz an Tag 28 beobachtet werden.

Die Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 zeigte nach 28 Tagen einen vorteilhaften Effekt auf das Verhältnis der Expression von COL2A1 zu COL1A1 (Abb. 14, F), wobei eine signifikante Verbesserung in der SMHA + TGF- $\beta$ 1-Gruppe beobachtet werden konnte (mRNA Expression von COL2A1/ COL1A1 in SMHA + TGF- $\beta$ 1 1 d vs. SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d:  $p = 0.0414$ ). Durch Hinzugabe von HA-Tyr zeigte sich an beiden Messzeitpunkten sowohl mit, als auch ohne TGF- $\beta$ 1, eine wenig verbesserte Tendenz in den jeweiligen SMHA-Gruppen verglichen mit ihren korrespondierenden SM-Gruppen.





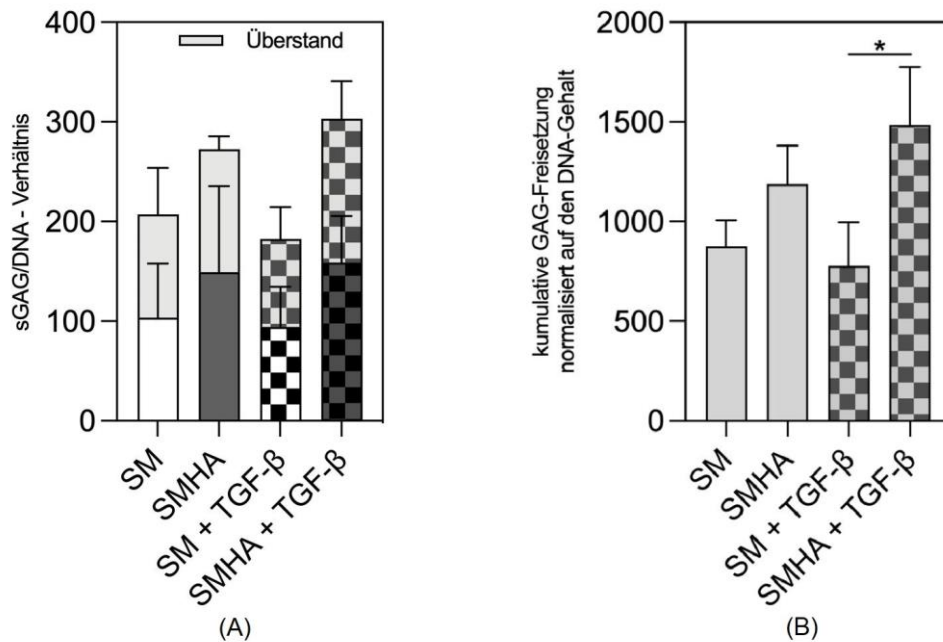
**Abbildung 14:** qPCR-Messung der relativen Genexpression chondrogener Marker (**A:** COL2A1; **B:** ACAN; **C:** SOX9), Markern der Dedifferenzierung (**D:** COL1A1; **E:** COL10A1), sowie das COL2A1/COL1A1 Verhältnis (**F:**) nach 1 und 28 Tagen nach Einbettung in das jeweilige Biomaterial. Die relative Genexpression wurde auf das Housekeeping-Gen GAPDH einer unbehandelten Kontrollgruppe in Monolayerkultur (Expressionslevel = 1) normalisiert. Signifikante Unterschiede werden durch ein „\*-Symbol mit \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Die Daten sind als Mittelwerte + SD aufgeführt ( $n = 3$ ).

#### 4.5 Chondrogene EZM Neosynthese

Für die Untersuchung der GAG-Biosynthese wurde die Konzentration an sGAGs in den Biomaterialien selber (Abb. 15A) und aus den Überständen (Abb. 15B), nach 28 Tagen, mittels DMMB-Assay bestimmt und auf ihren DNA-Gehalt normalisiert. Genauer wurden Proben des Kulturüberstandes zum einen gemittelt (Abb. 15A) und zum anderen kumulativ gesammelt (Abb. 15B) analysiert.

Die Anwesenheit von HA-Tyr bewirkte ohne Wachstumsfaktor eine etwa 143,97 % erhöhte sGAG Biosynthese innerhalb des Scaffolds im Vergleich zur alleinigen SM-Gruppen (SMHA 28 d = 149,085 vs. SM 28 d = 103,551), wobei eine statistische Signifikanz nicht erreicht wurde. TGF- $\beta$ 1 schien die Akkumulation innerhalb des Scaffolds höchstens marginal zu beeinflussen (SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d = 158,996 vs. SM + TGF- $\beta$ 1 28 d = 94,2335). Bei der Untersuchung der gemittelten Überstände ließ sich ein ähnliches Ergebnis beobachten. Auch hier wiesen beide Kombinationsgruppen im Vergleich zu ihren SM-Gruppen eine gesteigerte EZM Synthese über den Versuchszeitraum auf. Ebenfalls ließ sich kein signifikanter Einfluss von TGF- $\beta$ 1 nachweisen. Lediglich war eine gering gesteigerte Tendenz in der SMHA-Gruppe zu verzeichnen (SM 28 d = 207,252 vs. SMHA 28 d = 272,37; SM + TGF- $\beta$ 1 28 d = 182,407 vs. SMHA + TGF- $\beta$ 1 28 d = 303,029).

Die Ergebnisse der kumulativ gesammelten Überstände korrelieren ebenfalls mit den bereits genannten Daten. Die SMHA-Gruppen zeigte eine höhere Tendenz an freigesetzten sGAGs im Vergleich zu ihren SM-Gruppen auf, wobei der Unterschied unter Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 signifikant war (SM + TGF- $\beta$ 1 kumulativ 28 d = 777,29 vs. SMHA + TGF- $\beta$ 1 kumulativ 28 d = 1483,44 mit  $p = 0,0239$ ; Abb. 15B).

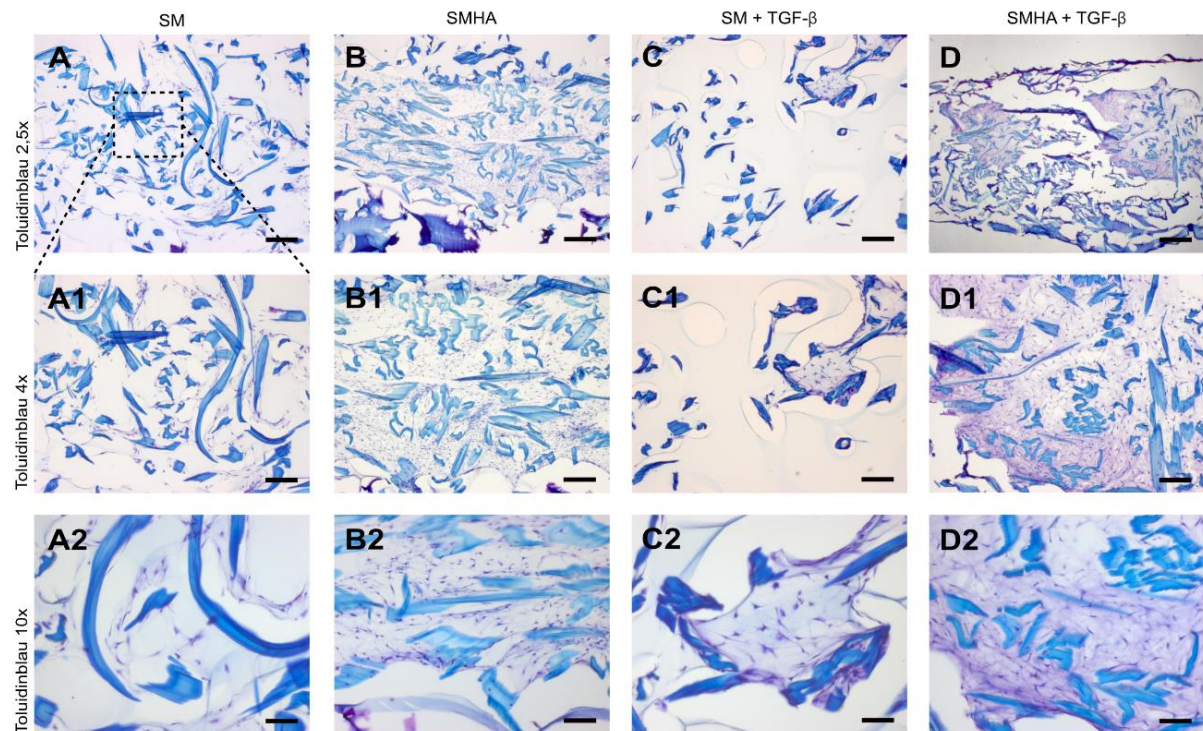


**Abbildung 15:** Quantifizierung des sGAG-Gehalts und der -Biosynthese im Verhältnis zur DNA der SM- und SMHA-Gruppe nach 28 Tagen Kultivierung im Biomaterial (unten) und im Überstand (oben, hellgrau hinterlegt) (A). Kumulativer sGAG-Gehalt des Kulturüberstandes über 28 Tage (B). Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind durch ein „\*“-Symbol gekennzeichnet. Die Daten sind als Mittelwerte + SD aufgeführt ( $n = 3$ ).

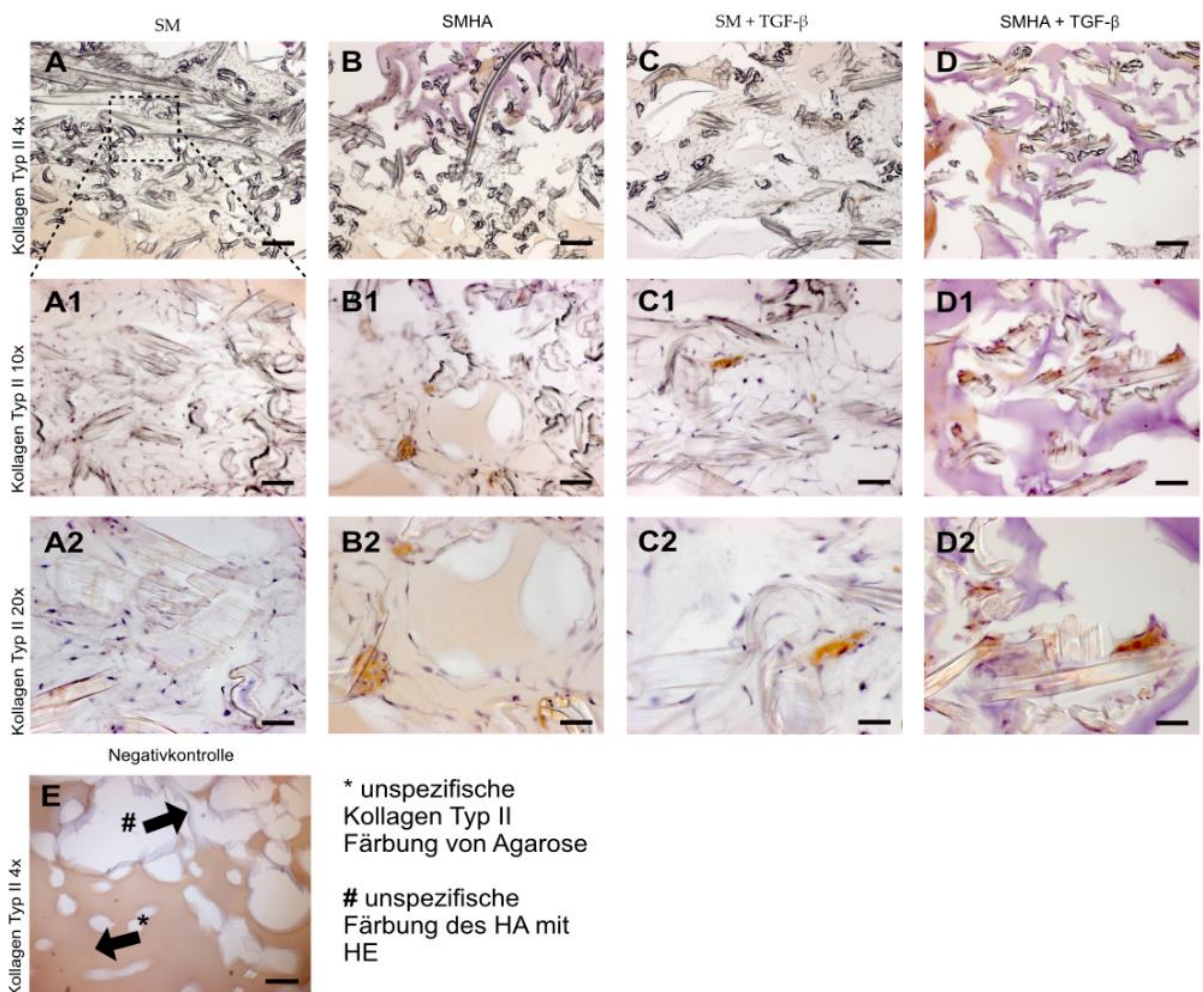
#### 4.6 Histologie und Immunhistochemie

Für die histologischen Untersuchung der EZM wurden die Proben mittels Toluidin-Blau gefärbt. In den repräsentativen Bildern (Abb. 16) sind Seidenfibroinfasern und gegebenenfalls Hydrogelreste blau zu erkennen. Durch die azidophile Metachromasie werden sGAGs lichtmikroskopisch violett sichtbar. Proben der SMHA-Gruppe zeigten nach 28 Tagen eine stärkere Metachromasie und somit eine höhere Konzentration an GAGs, als ihre korrespondierenden SM-Gruppen. Unter Anwesenheit von TGF-β1 zeigte sich dieser Effekt verstärkt (Abb. 16, D2).

Die immunhistochemische Untersuchung der Kollagen Typ 2 Biosynthese ergab ein ähnliches Resultat (Abb. 17). Eine durch Antikörperpräzipitation intensivere Braunfärbung und somit erhöhte Kollagen Typ 2 Konzentration konnte in den SMHA-Gruppen im Vergleich zur ihren SM-Gruppen beobachtet werden. Dabei schienen HA-Tyr und TGF-β1 einen synergistischen Effekt auf die Kollagen Typ 2 Synthese zu haben, da sich die Färbung in der SMHA+TGF-β1-Gruppe am prominentesten präsentierte (Abb. 17, D2). Die Biomaterialien sind hier als teilweise transparente, violett bis etwas bräunliche Schlieren zu erkennen.



**Abbildung 16:** Histologische Analyse humaner Chondrozyten. Toluidin-Blau Färbung der sGAGs in der SM- (A, C) und SMHA-Gruppe (B, D). Den Gruppen C und D wurde jeweils TGF-β1 hinzugegeben. Repräsentative Bilder der Versuchsgruppen nach 28 Tagen Kultur. Maßstab A - D 100 μm, A1 - D1 50 μm und A2 - D2 25 μm.

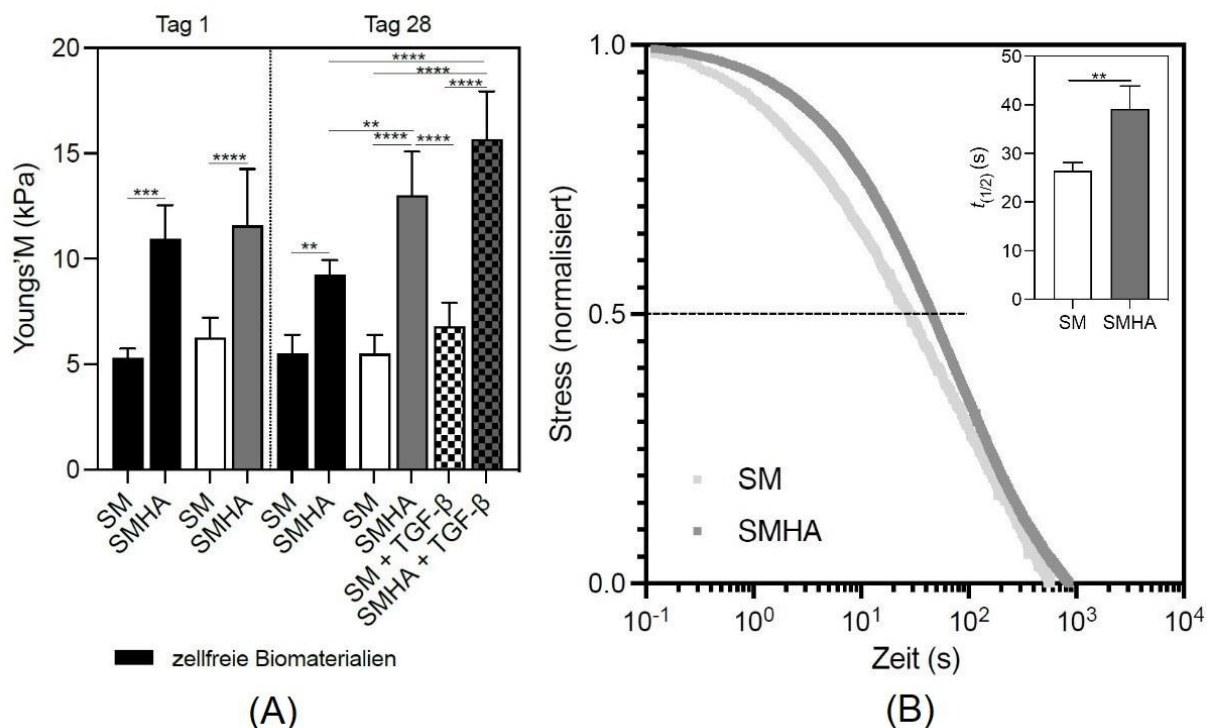




**Abbildung 17:** Immunhistochemie humaner Chondrozyten. Immunohistologische Färbung des Kollagens Typ 2 (Antikörperpräzipitation = braun) in der SM- (A, C) und SMHA-Gruppe (B, D). Den Gruppen C und D wurde jeweils TGF- $\beta$ 1 hinzugegeben. Gegenfärbung der Zellkerne mittels Meyer's Hämalaun. Repräsentative Bilder der Versuchsgruppen nach 28 Tagen Kultur. Die Negativkontrolle (E) zeigt eine unspezifische Bindung des Kollagens Typ 2 an Agarose, sowie Hämatoxylin-Eosin Färbung von HA-Tyr. Maßstab A – D 100  $\mu$ m, A1 - D1 50  $\mu$ m und A2 - D2 25  $\mu$ m.

#### 4.7 Biomechanische Analyse

Ein uneingeschränkter einstufiger Kompressionstest zeigte eine signifikante Erhöhung der Gerüststeifigkeit durch Hinzufügen von HA-Tyr zur SM (Abb. 18 a). Die Primärsteifigkeit von SMHA war signifikant höher im Vergleich zur alleinigen SM ( $p = 0,0003$ ). Die Anwesenheit von hCh beeinflusste die Steifigkeit des Biomaterials nach 24 h nicht. Nach 28 Tagen war das Young's Modul in der SMHA-Gruppe signifikant höher im Vergleich zu allen SM-Gruppen und zellfreier SMHA. Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einer Erhöhung der Probensteifigkeit ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die Stressrelaxationszeit ( $t_{1/2}$ ) unter einer konstanten Belastung von 30 % wurde durch Zugabe von HA-Tyr zu SM signifikant verlängert (SM 26,38  $\pm$  1,77 sec vs. SMHA 39,12  $\pm$  4,76 sec;  $p = 0.0075$ , Abb. 18 b).



**Abbildung 18:** Biomechanische Analyse der biologischen Trägersysteme. Young's Modul (A) der SM- und SMHA-Gruppe mit und ohne eingebettete Zellen nach 1 und 28 Tag/en in Kultur ( $n = 6$ ). Spannungsrelaxationszeit (s)  $t_{1/2}$  der beimpften SM- und SMHA-Gruppe (B). Es wurde eine repräsentative Kurve der Stressrelaxation in (b) von  $n = 3$  dargestellt. Signifikante Unterschiede werden durch ein „“-Symbol mit \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  und \*\*\*\*  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Die Daten sind als Mittelwerte + SD aufgeführt.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die zellbiologischen Voraussetzungen für zellbasierte Regenerationsverfahren zur Behandlung post-traumatischer, fokaler Knorpelschäden zu optimieren. Mit dem Fokus auf der Entwicklung eines potenten Zellträgersystems konnte ein biomimetisches Hybrid-Scaffold aus einer SM und einem HA-Tyr-Hydrogel etabliert werden. Die zellularisierten SMs zeigten im Vergleich ein besseres chondrogenes Potential, wenn sie zusätzlich in HA-Tyr eingebettet wurden. Unter Anwesenheit von HA verbesserten sich, gemäß der chondrogenen Marker und der EZM Neosynthese der funktionelle Phänotyp der hCh. Ebenfalls zeigte sich eine annähernd äquivalente chondro-induktive Potenz wie bei Applikation von TGF- $\beta$ 1. Darüber hinaus erhöhte die Kombination beider Biomaterialien die primären und ausgereiften biomechanischen Eigenschaften signifikant, wodurch sie mechanische Belastung besser aufnehmen konnten.

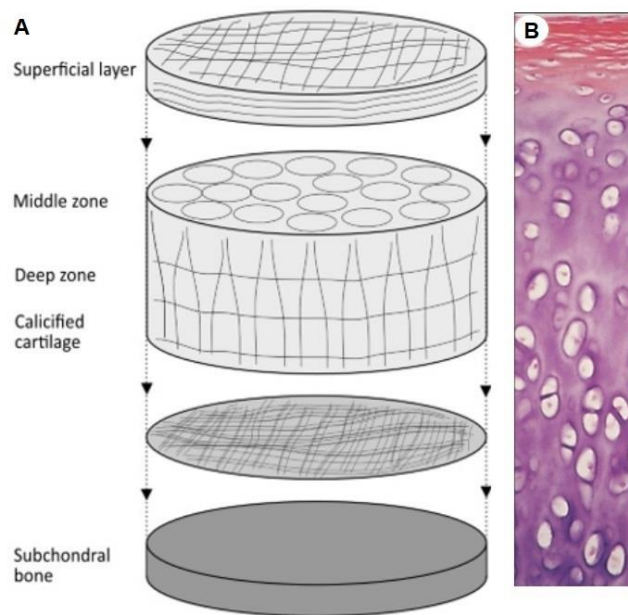
Einzelnen betrachtet stellen SM-Scaffolds und HA-Tyr-Hydrogele bereits vielversprechende Biomaterialien als Trägersysteme in der ACT dar. Seide bietet eine hervorragende Basis und ein hohes Variationspotential <sup>[39]</sup>. Mit ihrer abstimmbaren Biokompatibilität <sup>[40]</sup>, geringen Immunogenität <sup>[41]</sup> und Anpassungsmöglichkeit des biologischen Abbaus <sup>[42]</sup> besteht eine aussichtsvolle Grundlage für vitales Zellwachstum und perspektivisch eine klinische Anwendung. Ebenfalls ist hervorzuheben, dass SMs aufgrund ihrer hohen Hitzestabilität (je nach Verarbeitungstechnik bis zu 260 - 292 °C oder 286 – 350 °C <sup>[43],[44]</sup> zugänglich für Sterilisierungsprozesse wie u.a. Autoklavierung oder UV-Bestrahlung sind, ohne dabei ihre Struktur zu verlieren <sup>[45]</sup>, womit sich Seide von vielen anderen natürlichen Biomaterialien unterscheidet. Zudem können durch vielseitige Adaptation der Verarbeitung die mechanischen Eigenschaften bestimmt werden <sup>[46],[47]</sup>. Nicht zu vernachlässigen ist, dass Seide als Biomaterial nachhaltig, relativ einfach zugänglich und kosteneffizient hergestellt werden kann <sup>[48]</sup>.

Als zweite Komponente ergänzt das HA-Tyr-Hydrogel die SM in ihrer alleinigen unterlegenen mechanischen Belastbarkeit. Durch Anpassung der Vernetzungsreagenzien konnten in dieser Dissertationsarbeit die mechanoresilienten Eigenschaften des HA bzw. des SMHA nach Belieben abgestimmt werden <sup>[35]</sup>. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von HA chondropermissive Wirkungen auf die Zellen hat <sup>[49],[50]</sup>.

Es ist jedoch festzustellen, dass das Vorhandensein von Chondrozyten die viskoelastischen Eigenschaften des Hydrogels, die anhand von Änderungen des Speichermoduls bewertet wurden, zunächst beeinträchtigt <sup>[36]</sup>. Eine Reduktion der Zelldichte sollte aber aufgrund der günstigen Effekte auf die Zelldifferenzierung nicht angestrebt werden <sup>[51]</sup>. Zugleich sollte die Zelldichte ebenfalls nicht reduziert werden, da aus aktuellen Publikationen hervorgeht, dass eine erhöhte Zelldichte (20 - 60 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) und die damit einhergehende vermehrte Extrazellulärmatrixsynthese zu einer verbesserten knorpelmimetischen Funktion des Biomaterials führt <sup>[52],[53]</sup>. Dem Effekt des Verlustes der Primärsteifigkeit kann zudem durch eine Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration entgegengewirkt werden. Die initiale zytotoxische Wirkung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte durch den gleichzeitigen Anstieg der HRP-Aktivität geringfügig gemildert werden. Darüber hinaus konnten durch eine Erhöhung der HRP-Konzentration auf 1 U/ml, über 4 Tage chondroprotektive Wirkungen festgestellt werden. Demzufolge wurde eine Aktivität von 1 U/ml HRP für weitere Versuche ausgewählt und durch einfache Modifizierung des Gels eine erhöhte Steifigkeit erreicht. Um diese nicht zu beeinträchtigen, aber gleichzeitig zytotoxische Wirkungen zu minimieren, wurden die SM primär mit Zellen beimpft und erst sekundär in HA-Tyr eingebettet. Dennoch wurde in der ersten Woche der Kultivierung eine signifikante Abnahme der Zellvitalität in der Gruppe des SMHA-Hybridgerüsts festgestellt, welches höchstwahrscheinlich auf direkte zytotoxische Wirkungen des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> während der In-situ-Vernetzung zurückzuführen war <sup>[54]</sup>. Jedoch konnten sich die hCh im SMHA Trägersystem im Verlauf der Kultivierung erholen. Eine vollständige Matrixkolonisierung wurde in beiden Versuchsgruppen nach 28 Tagen beobachtet. Weitere Untersuchungen bezüglich der Zelladhäsion und Vitalität in der SM wurden von Frauchiger et al. <sup>[32]</sup> durchgeführt. Ein zusätzlich potentieller Vorteil der primären Zellaussaat auf die SM könnte in den unmittelbaren Wechselwirkungen mit der Zellmatrix bestehen. Interessanterweise konnte konfokalmikroskopisch keine Zellmigration ausgehend von Seidenfasern in das Hydrogel beobachtet werden, welches höchstwahrscheinlich auf zu wenig vorhandene, zelluläre Bindungsmotive im HA zurückzuführen ist. Zellproliferation und -migration traten lediglich entlang der Seidenfasern auf. Dabei kann eine unterschiedliche Bindungsaffinität der hCh eine entscheidende Rolle spielen. Beispielsweise interagieren Bindungsmotive, einschließlich RGD-Sequenzen, des Seidenfibroins mit  $\beta$ 1-enthaltenden Integrinen der Chondrozyten mit einer hohen Affinität <sup>[55]</sup>. Wechselwirkungen der Zelloberfläche mit HA mittels CD44 könnten für die

Zellmigration weniger entscheidend sein, obwohl bekannt ist, dass fokale Adhäsionsfaktoren durch CD44-Bindung moduliert werden <sup>[56]</sup>. Zell-Faser-Wechselwirkungen besitzen ein hohes Potenzial die Zelldifferenzierung zu beeinflussen, jedoch scheint in dieser Hinsicht der Faserdurchmesser einen entscheidenden Faktor zu bilden <sup>[57]</sup>. In HA-basierten Hydrogelen kann eine Zellmigration durch Modulation der Vernetzungsdichte, Chemolockstoff-Cofaktoren, sowie Modifikationen bewirkt werden. Allerdings ist nach Kenntnis der Autoren noch nicht bekannt, ob eine frühe und zahlreiche Zellmigration bei Knorpeldefekten vorteilhaft ist <sup>[58]</sup>. Im Gegensatz dazu könnten die Eigenschaften der in dieser Studie gewählten Seidenfasern zu nachteiligen Zell-Faser-Wechselwirkungen geführt haben. Während ein sphärischer Phänotyp auf differenzierte Chondrozyten hinweist, zeigten an SM adhärente Zellen eine flache, fibroblastenartige Zellform ähnlich wie in einer Monolayerkultur. Zusätzlich hatte die Anwesenheit von HA-Tyr keinen Einfluss auf die Morphologie, obwohl bekannt ist, dass in Hydrogel eingebettete Chondrozyten eine kugelförmige Morphologie annehmen <sup>[59],[60]</sup>. Wie kürzlich von Mohan et al. und Ziadlou et al. beschrieben, führt ein zunehmender Anteil an strukturegebender Matrix in Hydrogelen zu einer fibroblastenartigen De-differenzierung der Chondrozyten <sup>[61]</sup>. Andererseits haben Nürnberger et al. postuliert, dass die Zelldifferenzierung in faserbasierten Scaffolds über den Durchmesser der Fasern beeinflusst werden kann. Die Zellen konnten nicht flach auf dem Fasergerüst adhärent werden, sondern umschlangen die etwa 10 µm dicken Fasern mit ihren physiologisch kugelförmigen Zellkörpern <sup>[57]</sup>. Daher kann angenommen werden, dass der in dieser Dissertationsarbeit verwendete Faserdurchmesser von etwa 100 µm zu einer Entrundung der Zellen beigetragen hat. Aus diesem Grund könnten dünnere Fasern zu einer Optimierung der Matrices vorteilhaft sein. Zudem kann nicht nur auf zellulärer Ebene, sondern auch bezüglich mechanischer Eigenschaften das Seiden-Scaffold weiter optimiert werden. Modernste Verarbeitungstechniken stellen attraktive Möglichkeiten der Weiterentwicklung eines 3D Zellträgersystems dar. Anstatt eines wie in den eigenen Versuchen verwendeten homogenen Scaffolds, kann eine dem physiologischen Knorpel nachempfundene Architektur konstruiert werden. Es wird postuliert, dass damit die allgemeine Stabilität und besonders die gegen Scherkräfte gerichtete Mechanoresilienz verbessert werden kann. Weitere Versuchsansätze stehen an dieser Stelle jedoch noch aus, in welchen die natürliche Knorpelarchitektur

in Form unterschiedlicher Seidenfibroinphasen (layer) nachempfunden wird (sog. biomimetisches Scaffold, Abb. 19).



**Abbildung 19:** Schematische Zeichnung einer knorpelmimetischen Architektur eines Seidenfibroin Scaffolds (A). Histologisches Bild eines hyalinen Gelenkknorpels im Schnitt (B).

Obwohl keine Wirkung von HA auf die Zellmorphologie festgestellt wurde, veränderten sich Genexpressionsmuster und EZM-Synthese signifikant. Dies ist besonders wichtig, da die Zellexpansion per se bereits eine Dedifferenzierung verursacht. Die Redifferenzierung und EZM-Neosynthese ist für die funktionelle Transplantatreifung und suffiziente Integration des Trägersystems in vivo unerlässlich. Der Verlust des Phänotyps in Monolayerkulturen ist häufig durch Verschiebungen der Genexpression von COL2 zu COL1 gekennzeichnet [62],[63]. In der eigenen Arbeit wurde beobachtet, dass das Hybridgerüst vorwiegend die COL2-Induktion unterstützte, welches unter Zugabe von TGF- $\beta$ 1 signifikant wurde. In Anwesenheit von HA neigten die Chondrozyten dazu, die COL2-Expression zu induzieren, welches die positive Wirkung des Hydrogels auf die Stabilisierung des funktionellen Phänotyps unterstreicht. Beim Transkriptionsfaktors SOX9 konnte lediglich eine Zunahme in den Gruppen mit TGF- $\beta$ 1 über den Untersuchungszeitraum beobachtet werden. Die initial erhöhte Expression in der Hybrid-Gruppe könnte ein Hinweis auf einen positiven Differenzierungseffekt sein, jedoch zeigte sich eine deutliche Runterregulation im Verlauf. Dazu sei jedoch gesagt, dass zum einen nur mRNA Expression gemessen wurde und zum anderen SOX9 eine regulierende Funktion aufweist. Es kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass bei einer nicht mehr hochregulierten Expression nicht trotzdem Stufen der Proteinsynthese pro-chondrogen ablaufen könnten. Der Hypertrophiemarker COL10A1 zeigte sich in beiden TGF- $\beta$ 1-Gruppen nach 28 Tagen



erhöht, wobei der Vergleich zwischen SM-HA nach 28 Tagen mit beiden TGF- $\beta$ 1-Gruppen nach einem Tag signifikant war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass ein natürlicheres Zellwachstum ohne direkt stimulierende Faktoren einen positiven Einfluss auf die Differenzierung haben könnte.

Chondro-induktive Wirkungen von HA gingen parallel mit der sGAG-Synthese einher, welches durch den Trend zu einem höheren Gehalt in Hybridgerüsten ohne signifikanten Anstieg durch die TGF- $\beta$ 1-Behandlung offenbart wurde. Darüber hinaus konnte histologisch eine signifikante Steigerung der sGAG- und COL2-Synthese unter Anwesenheit von HA gezeigt werden.

Während die chondro-induktiven Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 in der Literatur akzeptiert sind, unterstützen diese Ergebnisse nachdrücklich die Anwendung von HA in Hybrid-Scaffolds. HA hat nicht nur einen positiven Einfluss auf das zelluläre Verhalten, ihre Zugabe erhöhte zudem signifikant die anfängliche Gerüststeifigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Verwendung von Seide bezüglich ihrer biomechanischen Belastbarkeit dem Hybridsystem signifikant unterliegt. Mit Hilfe der Kombination konnte eine erhöhte Primärsteifigkeit im einstufigen Kompressionstest, ein verbessertes Young's Modul, sowie eine bessere Resistenz unter konstanter Belastung erreicht werden. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die in situ, mittels HA-Tyr quervernetzten, Seidenfasern zurückzuführen. Darüber hinaus lieferte das Hybrid-Scaffold aus SM und HA-Tyr günstige biomechanische Eigenschaften in Bezug auf die gewünschte Stressrelaxation. Lee et al. zeigten eine Stressrelaxationszeit < 63 Sekunden als entscheidenden Parameter für die Chondrogenese <sup>[64]</sup>. Die im Verlauf histologisch beobachtete Anreicherung an EZM, ging mit einer erhöhten Gerüststeifigkeit einher, wobei dieser Effekt synergistisch von HA und TGF- $\beta$ 1 verstärkt wurde. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass in HA-Tyr eingebettete mesenchymale Signalzellen durch multiaxiale mechanische Belastung eine gesteigerte endogene TGF- $\beta$ 1-Aktivierung aufweisen, welche wiederum zu einer Chondrozyten-ähnlichen Differenzierung der Zellen führte und zusätzlich die EZM-Synthese der Chondrozyten förderte <sup>[36]</sup>. Daher ist eine mechanische Primärsteifigkeit höchst wünschenswert, um eine mechanoinduzierte, chondrogene Reifung zu ermöglichen.

## 5.1 Limitationen

Die verwendeten hCh stammten vom hyalinen Gelenkknorpel explantierter Femurköpfe von Patient:innen, die eine TEP erhalten hatten und damit bereits deutliche osteoarthrotische Veränderungen aufwiesen. Trotz vorsichtiger Präparation von makroskopisch unversehrten Arealen ist davon auszugehen, dass auf zellulärer Ebene bereits Veränderungen im Vergleich zum gesunden hyalinen Knorpel vorliegen. Beispielsweise liegen die mRNA Expressionswerte von ACT-Gewebe, welches mit jungen humanen Chondrozyten beimpft wurde für Typ 2 Kollagen deutlich über den in dieser Arbeit gemessenen Werten <sup>[65]</sup>.

Die heterogenen Gewebeeigenschaften der unterschiedlichen Spender sowie die geringe Anzahl limitieren die Generalisierbarkeit der Ergebnisse.

Die Übertragbarkeit der in dieser Dissertationsschrift gewonnen Erkenntnisse, in die in vivo Situation ist gleichermaßen durch zahlreiche Faktoren limitiert. Das verwendete Kulturmedium unterscheidet sich von dem physiologischen Gelenkmilieu. Es ist bekannt, dass das den Knorpeldefekt umgebende mitgeschädigte Knorpelgewebe, das Mikromilieu im Defektbereich beeinflusst. Dieses wurde in vorausgegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt <sup>[66]</sup>. Auch die Gelenkschleimhaut (Synovia) und die hiervon ausgehenden Immunreaktionen fanden in dieser Projektarbeit keine Berücksichtigung <sup>[67]</sup>.

## 6 Zusammenfassung

Die autologe Chondrozytentransplantation (körpereigene Knorpelzelltransplantation) ist bereits in der klinischen Anwendung seit mehreren Jahren eine etablierte Methode im Feld der matrixassoziierten knorpelregenerativen Verfahren. Dennoch besteht in den zur Verfügung stehenden Trägersystemen weiterhin die Problematik ein optimales Mikromilieu für humane Chondrozyten (hCh; menschliche Knorpelzellen) zu erzeugen, welches sowohl eine vitale Proliferation und Differenzierung ermöglicht, als auch eine knorpelmimetische mechanische Belastbarkeit gewährleistet. Um ein modernes Biomaterial zu entwickeln sind Kenntnisse über die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen essentiell. Das Ziel dieser Dissertationsschrift war es ein hochmodifizierbares Hybridscaffold aus einer Seidenfibroinmatrix und einem Hydrogel auf Hyaluronsäurebasis, als Trägersystem in matrixassoziierten knorpelregenerativen Verfahren zu entwickeln.

Aus operativ entfernten Hüftköpfen stammende, in Monolayerkulturen expandierte hCh ( $n = 3$ ) wurden in eine 3D-Matrix aus Seidenfibroin (Faserdurchmesser 50 – 100  $\mu\text{m}$ ; ITM, TU Dresden) eingebettet und von einem Hyaluronsäure-Tyramin-Hydrogel (AO Foundation, Davos) umspült. Die Zellen wurden in chondropermissivem Medium mit und ohne TGF- $\beta 1$  [10 ng/ml] kultiviert. Die Zellvitalität und -proliferation wurde mittels CellTiter-Blue Assay, Live/Dead-Färbung und Rasterelektronenmikroskopie (REM) bewertet. Die Zytomorphologie wurde ebenfalls mittels REM untersucht. Die Expression chondrogener Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsmarker (COL2A1, COL1A1, COL10A1, ACAN und SOX9) wurde anhand einer qPCR analysiert. Die Zellmatrix Neosynthese wurde mittels DMMB-Assay, Histologie, sowie Immunhistochemie untersucht. Um die Steifigkeit der Biomaterialien zu untersuchen führten wir einen Stress-Relaxations-Test mittels unbeschränkter 1-Schritt Kompression durch.

Über den Untersuchungszeitraum von 28 Tage konnten wir eine hohe Vitalität ( $> 95\%$ ) und homogene Kolonisation in beiden Gruppen, in erster Linie entlang der Seidenfibroinfasern, beobachten. Die hCh zeigten dabei einen ramifizierten Phänotyp und schmiegt sich flach an die Fasern an. Eine Migration in das Hydrogel in der Hybridgruppe konnte kaum beobachtet werden. Die Kombination mit einem Hydrogel führte zu einer verbesserten chondrogenen Redifferenzierung der hCh. Die Anwesenheit von Hyaluronsäure und TGF- $\beta 1$  steigerten die Expression von chondrogenen Markern und verbesserte speziell die COL2A/ COL1A ratio signifikant.

Zusätzlich bat das Hydrogel in sich eine verbesserte Primärsteifigkeit und führte in Kombination mit der durch sie gesteigerten Matrixsynthese und -retention im Biomaterial zu einer überlegeneren mechanischen Stabilität.

Wir konnten in dieser Studie ein hochgradig modulierbares zytokompatibles Hybridgerüst mit chondroinduktiven Eigenschaften entwickeln, welches eine Einkapselung von langfristig lebensfähigen Chondrozyten ermöglichte, sowie die mechanische Resistenz verbesserte. Zukünftige Forschung soll das Wissen über Zell-Matrix-Wechselwirkungen unter Berücksichtigung von kleinkalibrigen Faserdurchmessern vertiefen. Daran anschließend stellt ein mehrphasiger Versuchsaufbau zur biomimetischen Optimierung der Knorpelfaserarchitektur und ein möglicher Einfluss einer oberflächlichen Zone auf die Resilienz gegenüber Scherkräften interessante Folgeuntersuchungen dar.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Curl, W. W., Krome, J., Gordon, E. S., *et al.* Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 13: 456-460, (1997).
2. Årøen, A., Løken, S., Heir, S., *et al.* Articular Cartilage Lesions in 993 Consecutive Knee Arthroscopies. *Am J Sports Med* 32: 211-215, (2004).
3. Culvenor, A. G., Øiestad, B. E., Hart, H. F., *et al.* Prevalence of knee osteoarthritis features on magnetic resonance imaging in asymptomatic uninjured adults: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 53: 1268-1278, (2019).
4. Everhart, J. S., Abouljoud, M. M., Kirven, J. C., *et al.* Full-Thickness Cartilage Defects Are Important Independent Predictive Factors for Progression to Total Knee Arthroplasty in Older Adults with Minimal to Moderate Osteoarthritis. *Journal of Bone and Joint Surgery* 101: 56-63, (2019).
5. Jungmann, P. M., Gersing, A. S., Baumann, F., *et al.* Cartilage repair surgery prevents progression of knee degeneration. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 27: 3001-3013, (2019).
6. Cicuttini, F., Ding, C., Wluka, A., *et al.* Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: A prospective study. *Arthritis Rheum* 52: 2033-2039, (2005).
7. Ding, C., Cicuttini, F. & Jones, G. Tibial subchondral bone size and knee cartilage defects: relevance to knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 479-486, (2007).
8. Becher C, Landgraeber S, Fickert S, *et al.* Behandlung von Knorpelschäden an Knie, Sprunggelenk und Hüfte. Zusammenfassung Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration/ Treatment of cartilage defects in the knee, ankle and hip joint. Guidelines from the Group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Traumatology (DGOU). *OUP* 7: 580-587 (2018).
9. Mainil-Varlet, P., Aigner, T., Brittberg, M., *et al.* Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2: 45-57, (2003).
10. Niemeyer, P., Faber, S. & Bumberger, A. Handlungsempfehlung: Knorpeltherapie am Kniegelenk. *Knie Journal* 4 (1), (2022).
11. Toale, J., Shimozone, Y., Mulvin, C., *et al.* Midterm Outcomes of Bone Marrow Stimulation for Primary Osteochondral Lesions of the Talus: A Systematic Review. *Orthop J Sports Med* 7: 2325967119879127, (2019).
12. Rikken, Q. G. H., Dahmen, J., Stufkens, S. A. S., *et al.* Satisfactory long-term clinical outcomes after bone marrow stimulation of osteochondral lesions of the talus. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 29: 3525-3533, (2021).
13. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., *et al.* Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine* 331: 889-895, (1994).
14. Niemeyer, P., Albrecht, D., Andereya, S., *et al.* Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee* 23: 426-35, (2016).

15. Niemeyer, P., Laute, V., Zinser, W., *et al.* A Prospective, Randomized, Open-Label, Multicenter, Phase III Noninferiority Trial to Compare the Clinical Efficacy of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation With Spheroid Technology Versus Arthroscopic Microfracture for Cartilage Defects of the Knee. *Orthop J Sports Med* 7: 2325967119854442, (2019).
16. Huang, B. J., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 98: 1-22, (2016).
17. Stein, S., Strauss, E. & Bosco, J. Advances in the Surgical Management of Articular Cartilage Defects. *Cartilage* 4: 12-19, (2013).
18. Duarte Campos, D. F., Drescher, W., Rath, B., *et al.* Supporting Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Cartilage* 3: 205-221, (2012).
19. Stoop, R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury* 39: 77-87, (2008).
20. Sánchez-Téllez, D., Téllez-Jurado, L. & Rodríguez-Lorenzo, L. Hydrogels for Cartilage Regeneration, from Polysaccharides to Hybrids. *Polymers (Basel)* 9: 671, (2017).
21. Melesse, G., Atalie, D. & Koyrita, A. Structural and Thermal Properties of Ethiopian Eri and Mulberry Silk Fibres. *Advances in Materials Science and Engineering* 2020: 1-8, (2020).
22. Kundu, B., Kurland, N. E., Bano, S., *et al.* Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. *Prog Polym Sci* 39: 251-267, (2014).
23. Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., *et al.* Silk Fibroin of Bombyx mori Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio. *Journal of Biological Chemistry* 275: 40517-40528, (2000).
24. Kunz, R. I., Brancalhão, R. M. C., Ribeiro, L. de F. C., *et al.* Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Res Int* 2016: 1-19, (2016).
25. Aramwit, P., Siritientong, T. & Srichana, T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy* 30: 217-224, (2012).
26. Chirila, T. V., Suzuki, S. & McKirdy, N. C. Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from Bombyx mori silk cocoons. *Prog Biomater* 5: 135-145, (2016).
27. Michael Rheinnecker, Stefan Kohlhaas & Rolf Zimmat. Method and apparatus for extraction of arthropod gland. *United States Patent*. Patent No.: US 8,105,633 B2 (2012).
28. Wang, Y., Blasiolo, D., Kim, H., *et al.* Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 27: 4434-4442, (2006).
29. Brünler, R., Aibibu, D., Wöltje, M., *et al.* In silico modeling of structural and porosity properties of additive manufactured implants for regenerative medicine. *Materials Science and Engineering: C* 76: 810-817, (2017).
30. Font Tellado, S., Bonani, W., Balmayor, E. R., *et al.* Fabrication and Characterization of Biphasic Silk Fibroin Scaffolds for Tendon/Ligament-to-Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* 23: 859-872, (2017).
31. Choi, J. H., Kim, D. K., Song, J. E., *et al.* Silk Fibroin-Based Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol* 1077: 371-387, (2018).

32. Frauchiger, D., May, R., Bakirci, E., *et al.* Genipin-Enhanced Fibrin Hydrogel and Novel Silk for Intervertebral Disc Repair in a Loaded Bovine Organ Culture Model. *J Funct Biomater* 9: 40, (2018).
33. Wu, S.-C., Chang, J.-K., Wang, C.-K., *et al.* Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials* 31: 631-640, (2010).
34. Bauer, C., Niculescu-Morzs, E., Jeyakumar, V., *et al.* Chondroprotective effect of high-molecular-weight hyaluronic acid on osteoarthritic chondrocytes in a co-cultivation inflammation model with M1 macrophages. *J Inflamm* 13: 31, (2016).
35. Loebel, C., D'Este, M., Alini, M., *et al.* Precise tailoring of tyramine-based hyaluronan hydrogel properties using DMTMM conjugation. *Carbohydr Polym* 115: 325-333, (2015).
36. Behrendt, P., Ladner, Y., Stoddart, M. J., *et al.* Articular Joint-Simulating Mechanical Load Activates Endogenous TGF- $\beta$  in a Highly Cellularized Bioadhesive Hydrogel for Cartilage Repair. *Am J Sports Med* 48: 210-221, (2020).
37. Kurz, B., Domm, C., Jin, M., *et al.* Tissue engineering of articular cartilage under the influence of collagen I/III membranes and low oxygen tension. *Tissue Eng* 10: 1277-1286, (2004).
38. Gille, J., Kunow, J., Boisch, L., *et al.* Cell-Laden and Cell-Free Matrix-Induced Chondrogenesis versus Microfracture for the Treatment of Articular Cartilage Defects. *Cartilage* 1: 29-42, (2010).
39. Croft, A. S., Spessot, E., Bhattacharjee, P., *et al.* Biomedical applications of silk and its role for intervertebral disc repair. *JOR Spine* 5: 1225, (2022).
40. Guo, X., Lin, N., Lu, S., *et al.* Preparation and Biocompatibility Characterization of Silk Fibroin 3D Scaffolds. *ACS Appl Bio Mater* 4: 1369-1380, (2021).
41. Zhang, Y.-Q., Zhou, W.-L., Shen, W.-D., *et al.* Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-I-asparaginase bioconjugates. *J Biotechnol* 120: 315-326, (2005).
42. Cao, Y. & Wang, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int J Mol Sci* 10: 1514-1524, (2009).
43. Cebe, P., Partlow, B. P., Kaplan, D. L., *et al.* Silk I and Silk II studied by fast scanning calorimetry. *Acta Biomater* 55: 323-332, (2017).
44. Zhao, M., Qi, Z., Tao, X., *et al.* Chemical, Thermal, Time, and Enzymatic Stability of Silk Materials with Silk I Structure. *Int J Mol Sci* 22: 4136, (2021).
45. Rnjak-Kovacina, J., Tang, F., Whitelock, J. M., *et al.* Silk biomaterials functionalized with recombinant domain V of human perlecan modulate endothelial cell and platelet interactions for vascular applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 148: 130-138, (2016).
46. Zhao, Y., Zhu, Z. S., Guan, J., *et al.* Processing, mechanical properties and bio-applications of silk fibroin-based high-strength hydrogels. *Acta Biomater* 125: 57-71, (2021).
47. Johari, N., Moroni, L. & Samadikuchaksaraei, A. Tuning the conformation and mechanical properties of silk fibroin hydrogels. *Eur Polym J* 134: 109842, (2020).
48. DeBari, M. K., King, C. I., Altgold, T. A., *et al.* Silk Fibroin as a Green Material. *ACS Biomater Sci Eng* 7: 3530-3544, (2021).

49. Chung, C. & Burdick, J. A. Influence of Three-Dimensional Hyaluronic Acid Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 15: 243-254, (2009).
50. Dvořáková, J., Kučera, L., Kučera, J., *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a hydrogel system based on an enzymatically crosslinked tyramine derivative of hyaluronan. *J Biomed Mater Res A* 102: 3523-3530, (2014).
51. Sun, A. X., Lin, H., Fritch, M. R., *et al.* Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in 3-dimensional, photocrosslinked hydrogel constructs: Effect of cell seeding density and material stiffness. *Acta Biomater* 58: 302-311, (2017).
52. Erickson, I. E., Kestle, S. R., Zellars, K. H., *et al.* High mesenchymal stem cell seeding densities in hyaluronic acid hydrogels produce engineered cartilage with native tissue properties. *Acta Biomater* 8: 3027-3034, (2012).
53. Erickson, I. E., Huang, A. H., Sengupta, S., *et al.* Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1639-1648, (2009).
54. Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., *et al.* Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med* 49: 1298-1305, (2010).
55. Davidenko, N., Schuster, C. F., Bax, D. V., *et al.* Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 27: 148, (2016).
56. Fujita, Y., Kitagawa, M., Nakamura, S., *et al.* CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett* 528: 101-108, (2002).
57. Nuernberger, S., Cyran, N., Albrecht, C., *et al.* The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts. *Biomaterials* 32: 1032-1040, (2011).
58. Vainieri, M. L., Lolli, A., Kops, N., *et al.* Evaluation of biomimetic hyaluronic-based hydrogels with enhanced endogenous cell recruitment and cartilage matrix formation. *Acta Biomater* 101: 293-303, (2020).
59. Jin, G.-Z. & Kim, H.-W. Efficacy of collagen and alginate hydrogels for the prevention of rat chondrocyte dedifferentiation. *J Tissue Eng* 9: 2041731418802438, (2018).
60. Jooybar, E., Abdekhodaie, M. J., Alvi, M., *et al.* An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 83: 233-244, (2019).
61. Mohan, R., Mohan, N. & Vaikkath, D. Hyaluronic Acid Dictates Chondrocyte Morphology and Migration in Composite Gels. *Tissue Eng Part A* 24: 1481-1491, (2018).
62. Benya, P. D., Padilla, S. R. & Nimni, M. E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15: 1313-1321, (1978).
63. Benya, P. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215-224, (1982).
64. Lee, H., Gu, L., Mooney, D. J., *et al.* Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes. *Nat Mater* 16: 1243-1251, (2017).



65. Albrecht, C., Tichy, B., Nürnberger, S., *et al.* Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis Cartilage* 19: 1219-1227, (2011).
66. Kurz, B., Hart, M. L. & Rolauffs, B. Mechanical Articular Cartilage Injury Models and Their Relevance in Advancing Therapeutic Strategies. *Adv Exp Med Biol.* 1402: 107-124, (2023). doi:10.1007/978-3-031-25588-5\_8.
67. Dwivedi, G., Flaman, L., Alaybeyoglu, B., *et al.* Inflammatory cytokines and mechanical injury induce post-traumatic osteoarthritis-like changes in a human cartilage-bone-synovium microphysiological system. *Arthritis Res Ther* 24: 198, (2022).

## 8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius, für die Bereitstellung und Nutzung der Räumlichkeiten des Anatomischen Institutes zu Kiel.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen herzlich bedanken, die mich bei dem Prozess dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. Peter Behrendt für das Vertrauen und die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas an mich. Außerdem möchte ich mich bei Ihm und meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Jan Weitkamp für die hervorragende Betreuung und Unterstützung auf diesem Weg bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bodo Kurz für die Möglichkeit der praktischen Durchführung dieser Arbeit im Institut für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und seinen wissenschaftlichen Rat bedanken. Zudem danke ich den Wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und darunter besonders Herrn Frank Lichte, Frau Rita Kirsch und Frau Bettina Schröder für die Einführung in die verschiedenen labortechnischen Methoden und die freundliche Hilfe.

Ich bedanke mich bei Dr. Michael Wöltje der TU Dresden und Dr. David Eglin (ehemals ARI, Davos) für die freundliche Kooperation und Bereitstellung der Seidenfibroinmatrix und der HA-Tyr Hyaluronsäure.

Außerdem möchte ich mich bei der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die finanzielle Unterstützung im Rahmen meines gewährten Doktoranten-Stipendiums danken, welches mir eine sorgenfreie Fokussierung auf meine Dissertation ermöglicht hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht stets geduldig unterstützen haben.

## 9 Veröffentlichung

1) **Peer-reviewed Journal: Silk Fiber-Reinforced Hyaluronic Acid-Based Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering**

International Journal of Molecular Science, 31 March 2021,31;22(7):3635. doi: 10.3390/ijms22073635.

Jan-Tobias Weitkamp, Michael Wöltje, **Bastian Nußpickel**, Felix N. Schmidt, Dilbar Aibibu, Andreas Bayer, David Eglin, Angela R. Armiento, Philipp Arnold, Chokri Cherif, Ralph Lucius, Ralf Smeets, Bodo Kurz and Peter Behrendt.

2) Poster: Hybrid Biomaterials for Cartilage Tissue Regeneration. Jan-Tobias Weitkamp, **Bastian Nußpickel**, Michael Wöltje, Bodo Kurz, Peter Behrendt, Ralph Smeets. 138. Deutscher Chirurgenkongress (DCK Digital) 2021

## 10 Eidesstattliche Versicherung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, Bastian Nußpickel, ehrenwörtlich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Neumünster, 05.02.2025  
Ort, Datum

  
Unterschrift