

Aus der Abteilung für Mikrogravitation und
Translationale Regenerative Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Einfluss von simulierter Mikrogravitation auf die trägerfreie *de novo* Chondrogenese
aus humanen und murinen primären Chondrozyten

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Paul Steinwerth
aus Magdeburg
Magdeburg, 2024

Betreuerin:

Frau Professor Dr. med. Daniela Grimm

Abteilung für Mikrogravitation und Translationale Regenerative Medizin,
Medizinischen Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Unterstützende Betreuung:

Frau Professor Dr. rer. nat. Jessica Bertrand

Forschungsbereich Experimentelle Orthopädie, Orthopädischen Universitätsklinik,
Medizinische Fakultät. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Datum der Verteidigung:

Bibliographische Beschreibung:

Steinwerth, Paul: Einfluss von simulierter Mikrogravitation auf die trägerfreie de novo Chondrogenese aus humanen und murinen primären Chondrozyten. – 2024. – 80 Bl., 12 Abb., 5 Tab.

Kurzreferat:

Als einzige Zellform des Knorpelgewebes spielen Chondrozyten eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung dieser Gewebeart. Die Herstellung von artifiziellem Knorpel steht hinsichtlich der zunehmenden Prävalenz von knorpeldegenerativen Erkrankungen im Fokus der translationalen Medizin. Durch simulierte Mikrogravitation (s- μ g) konnte an diversen Zellarten das dreidimensionale Wachstum von Zellaggregaten, sogenannten multizellulären Sphäroiden, nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird das trägermaterialfreie Wachstum von Sphäroiden unter Verwendung einer ‚*Rotating Wall Vessel*‘ (RWV) an drei verschiedenen Chondrozyten-Zellkulturen nach drei, sieben und 14 Tagen untersucht. Neben der Etablierung der RWV als Methode der Sphäroidbildung sollen Veränderungen der extrazellulären Matrix, Zytoskelettkomponenten und Regulationsfaktoren untersucht werden. Hierfür werden histochemische und Immunfluoreszenzfärbungen, sowie die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qPCR) genutzt. Bereits nach sieben Tagen konnten 2 – 5 mm durchmessende Sphäroide nachgewiesen werden, welche eine zentrale Akkumulation des Kollagen-Typs I und peripher der Kollagen-Typen II und X aufwiesen. Auch progrediente Apoptose war nachweisbar. Die qPCR zeigte je nach Zellkultur verschiedene Veränderungen in der Expression von Kollagentypen und Regulationsfaktoren, mit Gemeinsamkeiten hinsichtlich MMP13, SOX9 und RUNX3. Zusammenfassend konnte Gewebe mit Knorpelcharakteristiken hergestellt werden. Der Einfluss übereinstimmender Faktoren sollte weiter untersucht werden.

Schlüsselwörter:

Knorpel, Chondrozyten, Rotating Wall Vessel, simulierte Mikrogravitation, Genexpression, Extrazelluläre Matrix, Tissue Engineering

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in Teilen bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Steinwerth P, Bertrand J, Sandt V, Marchal S, Sahana J, Bollmann M, Schulz H, Kopp S, Grimm D, Wehland M:

Structural and Molecular Changes of Human Chondrocytes Exposed to the Rotating Wall Vessel Bioreactor. *Biomolecules*. 14(1). 25 (2023)

Weitere Publikationen mit Beteiligung des Autors:

Wehland M, **Steinwerth P**, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lützenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D:

Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *International Journal of Molecular Sciences*. 21. 9596 (2020)

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	10
1.1. Knorpelbiologie.....	10
1.1.1. Knorpelarten.....	10
1.1.1.1. Aufbau und Zonen des hyalinen Knorpels.....	11
1.1.2. Chondrozyten.....	13
1.1.2.1. Extrazelluläre Matrix.....	13
1.2. Apoptose.....	14
1.2.1. Bedeutung der Apoptose für Chondrozyten.....	15
1.3. Ausgewählte Erkrankungen des Gelenkknorpels und Therapieoptionen.....	15
1.3.1. Arthrose.....	15
1.3.2. Aseptische Knochennekrosen und Osteochondrosis dissecans.....	17
1.4. Knorpelbiologie und Mikrogravitation.....	18
1.4.1. Definition von Schwerkraftbegriffen.....	18
1.4.2. Einfluss von Mikrogravitation auf Knorpelgewebe.....	18
1.5. Tissue Engineering.....	19
1.5.1. Bioreaktoren zur Simulation von Mikrogravitation.....	20
1.5.2. Nutzung von (simulierter) Mikrogravitation für das Tissue Engineering ..	21
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Material.....	24
2.1.1. Zelllinien.....	24
2.1.2. Geräte und Software.....	24
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.4. Chemikalien.....	26
2.1.5. Antikörper und qPCR-Primer.....	27
2.2. Methoden.....	29

2.2.1. Zellkulturen.....	29
2.2.1.1. Anzucht humaner Chondrozyten	29
2.2.1.2. Gewinnung und Anzucht muriner Chondrozyten	30
2.2.2. Vorbereitung und Durchführung bodengebundener Mikrogravitationssimulationen	31
2.2.2.1 Rotating Wall Vessel.....	31
2.2.3. Histologie	32
2.2.3.1. Histologische Färbungen – Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	33
2.2.3.2. Sirius Rot – Färbung.....	33
2.2.3.3. von-Kossa/Safranin-O Färbung	34
2.2.3.4. Immunhistochemische Färbungen.....	34
2.2.4. Apoptosedetektion	35
2.2.5. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und	36
Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	36
2.2.5.1. RNA-Isolation	36
2.2.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration.....	36
2.2.5.3. cDNA-Synthese	37
2.2.5.4. quantitative Echtzeit PCR	37
2.2.6. STRING Analysis (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, V11.5).....	38
2.2.7. Statistik.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Morphologie der dreidimensionalen Knorpelstrukturen in der RWV	39
3.2. Histologische und immunhistochemische Analysen der humanen und murinen Sphäroide	40
3.2.1. Betrachtung der histologischen Präparate	40
3.2.2. Untersuchung der immunhistochemischen Präparate.....	42
3.2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der humanen Proben	42

3.2.2.2. Ergebnisse der murinen Proben	43
3.3. Genexpression von chondrozytären Signalfaktoren in 3D-Sphäroiden.....	44
3.3.1. Genexpression der C28/12 Sphäroide	44
3.3.2. Genexpression der Sphäroide der primären humanen Chondrozyten	46
3.3.3. Genexpression der murinen Sphäroide.....	49
3.4. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) Analyse	50
4. Diskussion.....	52
4.1. Tissue Engineering unter Mikrogravitationsbedingungen	53
4.2. Proteine der extrazellulären Matrix und regulatorische Signalfaktoren im Neoknorpel aus Chondrozyten der C28/12 Zelllinie.....	54
4.3. Regulation unterschiedlicher Signalwege von biologischen Prozessen im Neoknorpel aus primären humanen Chondrozyten	57
4.4. STRING-Analyse-basierte Darstellung eines Interaktionsnetzwerkes der untersuchten Gene	60
4.4.1. Geninteraktionen von C28/12 Chondrozyten unter Mikrogravitation	60
4.4.2. Geninteraktionen von primären humanen Chondrozyten unter Mikrogravitationsbedingungen	61
4.5. Protein- und Genexpression von murinen Knorpelzellen in simulierter Mikrogravitation	62
4.6. Ausblick	63
5. Zusammenfassung.....	64
6. Summary.....	65
7. Literaturverzeichnis	66
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	76
I Danksagung	77
II Ehrenerklärung.....	78
III Darstellung des Bildungsweges	80

Abkürzungsverzeichnis

<i>18S</i>	18-S Untereinheit des ribosomalen Komplexes
3D	Dreidimensional
<i>ACAN</i>	Aggrecan Gen
<i>ACTB</i>	Actin-beta Gen
ANOVA	Analysis of Variance
BSA	Bovines Serumalbumin
C28	C28/I2 Chondrozyten
<i>CASP</i>	Caspase Gen
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CGM	Chondrocyte Growth Medium
<i>COL10A1</i>	A1-Untereinheit des Kollagen 10 Gen
<i>COL1A1</i>	A1-Untereinheit des Kollagen 1 Gen
<i>COL2A1</i>	A1-Untereinheit des Kollagen 2 Gen
<i>CXCL8</i>	Cyclooxygenase 8 Gen, auch Interleukin-8 Gen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMOAD	Disease Modifying Drugs for Osteoarthritis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESA	European Space Agency (Europäische Raumfahrtbehörde)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACIT	Fibril associated collagens with interrupted triple helices
FGF	Fibroblast growth factor
G	Gravitation, Fallbeschleunigung
HARV-RCCS	High Aspect Rotating-Wall Vessel – Rotating Cell Culture System
hCHON	Humane Chondrozyten
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxia induced factor
IgG	Immunglobulin G
<i>IL6</i>	Interleukin-6 Gen
ISS	International Space Station (Internationale Raumstation)

<i>ITGB1</i>	Integrin-β1 Gen
<i>LAMA1</i>	Laminin-1 Gen
mCH	murine Chondrozyten
MMP	Metallomatrixprotease
mRNA	messenger RNA
N	Stoffmenge
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<i>PRG4</i>	Proteoglykan-4 Gen
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Random Positioning Machine
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RUNX	Runt-related transcription factor
RWV	Rotating Wall Vessel
s-μg	simulierte Mikrogravitation
<i>SOD</i>	Superoxiddismutase Gen
<i>SOX</i>	sex determining region Y-box Transkriptionsfaktor
<i>SPP1</i>	sekretiertes Phosphoprotein 1 Gen, Osteopontin-Gen
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
<i>TUBB</i>	β-Tubulin Gen
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick- End Labeling
<i>VIM</i>	Vimentin Gen

1. Einführung

1.1. Knorpelbiologie

1.1.1. Knorpelarten

Knorpelgewebe ist als eines der Bindegewebe des Körpers wesentlicher Bestandteil vieler Körperstrukturen. Dabei besteht Knorpel einfach ausgedrückt nur aus einem Zelltyp, den Knorpelzellen oder auch Chondrozyten genannt, welche eine besonders gestaltete extrazelluläre Matrix (EZM) bilden (1). Knorpel bildet neben formgebenden Anteilen von Ohren, Nase, Kehlkopf und weiteren Atemwegsgeweben als Gelenkknorpel (*Cartilago articularis*) einen Überzug über den gelenkbildenden Knochen aller echten Gelenke des Körpers. Dies dient der Reduktion der Reibung der Gelenkstrukturen über eine glatte Oberfläche, der Bildung von Gelenkflüssigkeit, und begünstigt die Lastübertragung auf den Knochen (2).

Allgemein gesehen ist Knorpel aus Chondrozyten, deren Vorläuferzellen Chondroblasten in geringer Menge und dem Interzellularraum aufgebaut. Als avaskuläres Gewebe ohne eigene Innervation ist Knorpel ein stoffwechselarmes Gewebe mit nur geringen Regenerationsmöglichkeiten (3). Es bildet sich aus den mesenchymalen Stammzellen und wächst dabei appositionell oder interstitiell (4). Das appositionelle Wachstum wird durch die Progenitorzellen des Perichondriums vorangetrieben, einer Deckschicht des Knorpels, welche in artikulärem Knorpel nicht vorkommt. Interstitiell wächst Knorpel über die Proliferation der Chondroblasten im Interzellularraum und vermehrter Bildung interzellulärer Substanz. Dabei werden drei Typen von Knorpelgewebe unterschieden: hyaliner, elastischer und Faserknorpel (4). Diese unterscheiden sich vor allem durch die Zusammensetzung ihrer EZM, welche der jeweiligen Funktion angepasst ist.

Elastischer Knorpel kommt beispielsweise an den Strukturen des auditiven Systems, sowie an der Epiglottis und den kleinsten Bronchien vor. Die EZM ist strukturell dem Aufbau des hyalinen Knorpelgewebes entsprechend und besitzt zudem elastische Fasernetze (5). Dadurch wird die spezifische Eigenschaft dieses Knorpeltyps, druck- und biegeelastisch zu sein, vermittelt. Hierbei ist das EZM-Protein Elastin von entscheidender Bedeutung (6).

Faserknorpel bildet Anteile der *Disci intervertebrales* und *articulares*, der Symphyse, der Menisken, sowie chondraler Sehnenansätze und verbindet die funktionellen Eigenschaften des zugfesten straffen Bindegewebes mit denen des druckelastischen Knorpels (5). Lamellenartig angeordnete, parallel verlaufende Fasern, welche von vereinzelt liegenden Chondrozyten durchsetzt sind, sind im Gegensatz zum hyalinen Knorpel meist aus Kollagen-Typ I aufgebaut. Zusätzlich wird die Struktur durch andere Kollagen-Subtypen konfiguriert, je nach Art des Faserknorpels (7; 8).

1.1.1.1. Aufbau und Zonen des hyalinen Knorpels

Der hyaline Knorpel ist der vorrangige Knorpeltyp im menschlichen Körper und an Gelenkflächen, Atemwegen, Rippen, Wachstumsplatten und Teilen des Primordialskeletts zu finden (5). Chondrozyten sind die zellulären Hauptbestandteile des Knorpels. Im hyalinen Subtyp liegen sie einzeln oder in Kleinstgruppen vor und bilden in der direkten Umgebung die perizelluläre und territoriale Matrix, welche sich in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) basophil darstellt. Die perizelluläre Matrix ist hierbei von der EZM deutlich abzugrenzen, zeichnet sich durch das Vorkommen von Kollagen-Typ VI aus und spielt eine wichtige Rolle bei der Chondrogenese und Signaltransduktion (9). Die perizelluläre und territoriale Matrix wird zusammen mit den Chondrozyten als „Chondron“ bezeichnet, die Matrix zwischen den Chondronen ist die interterritoriale Matrix (2).

Die extrazelluläre Matrix hingegen besteht zum größten Teil aus Kollagen-Typ II und Proteoglykanen, vorrangig Aggrecan (7). Diese bilden ein zonen-spezifisch organisiertes Netzwerk aus Fibrillen, welche Wasser in sich bündeln, und so wesentliche Aspekte der biomechanischen Funktionalität gewährleisten (s. Kapitel 1.1.2.1.).

Durch die in verschiedenen Bereichen des Knorpelgewebes unterschiedlichen Ausrichtungen des Geflechtes aus Proteoglykanen und Kollagenen lassen sich Zonen abgrenzen (Abbildung 1). Die oberflächlichste Zone ist die Tangentialzone (superficial/surface zone), welche ca. 10 - 20% des Knorpels ausmacht und damit die dünnste Schicht darstellt. Sie dient dem Schutz vor Scher- und Traktionskräften. Abgeflachte, meist vereinzelt liegende Chondrozyten produzieren hier hauptsächlich Kollagen und wenige Proteoglykane, wodurch viel Wasser gespeichert werden kann.

Die Fibrillen sind tangential zur Oberfläche entsprechend den Zugspannungen ausgerichtet (2; 5; 10).

Es schließt sich die mittlere oder auch Übergangszone (*transitional zone*) an. Sie ist biomechanisch und anatomisch das Bindeglied zwischen der überliegenden und unterliegenden Zone und umfasst 40 – 60 % des Knorpelvolumens. Die Chondrozyten beginnen sich zusammenzulagern und abzurunden, der Proteoglykananteil steigt. Die Fibrillen flachen ab und ziehen in Richtung der axialen Krafteinwirkung in die Tiefe. Funktionell stellt die Übergangszone den ersten Teil des Kompressionsschutzes dar (2; 5; 10).

Die tiefste Knorpelzone ist die Radiärzone (*deep zone*), welche ihren Namen aufgrund der vollständig radiär orientierten Fibrillen hat. Diese bilden Säulen, wodurch in der Gesamtschau ein arkadenartiges Fibrillengerüst entsteht, welches den einwirkenden Druck gleichmäßig verteilen und ableiten kann. Diese Zone nimmt ca. 30 % des Volumens ein, die Kollagenfibrillen sind am stärksten und der Proteoglykangehalt am höchsten, um die Stabilität zu sichern. Die meist zu Gruppen organisierten Chondrozyten dieser Zone liegen zwischen den Kollagen-„Säulen“. Sie sind groß und rundlich (2; 5; 10).

Der Knorpel wird durch eine Mineralisationszone (*calcified zone*) mit dem subchondralen Knochen verbunden und durch die sog. *tide mark* von den obenauf liegenden Zonen getrennt (Abbildung 1). Ein Durchbrechen dieser Grenzlinie ist

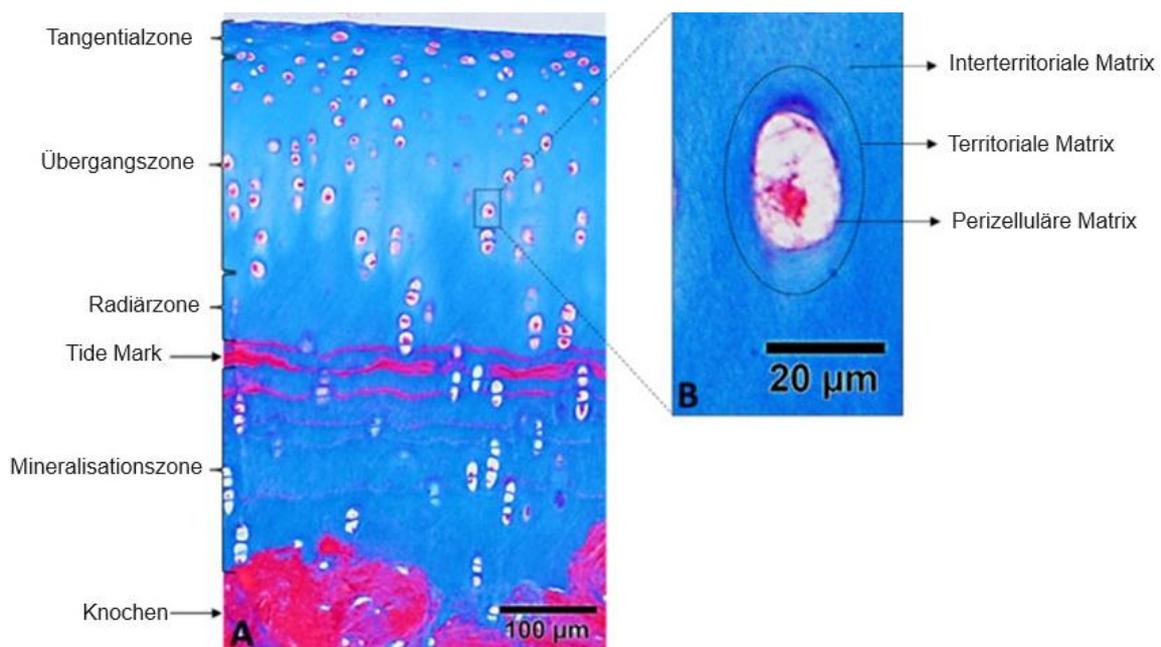


Abbildung 1 - Masson's Trichrom Färbung eines gesunden hyalinen Knorpels. (A) stellt die Knorpelzonen dar, (B) die Regionen der EZM. modifiziert nach Alcaide-Ruggiero et al. (10)

ursächlich für degenerative Knorpelveränderungen. Die Chondrozyten sind in dieser Zone sporadisch verteilt und hypertrophieren (2; 4; 5; 10).

1.1.2. Chondrozyten

Chondrozyten entstehen aus den mesenchymalen Stammzellen. Diese differenzieren sich zu Chondroblasten, welche über die Produktion von Knorpelmatrix sich selbst einbetten und zu Chondrozyten werden. Durch zunehmende Matrixproduktion vereinzeln sich die Chondrozyten, proliferieren jedoch gleichzeitig, was wiederum zum Knorpelwachstum führt (5). Die Chondrozyten machen dabei nur ca. 2 % der gesamten Knorpelmasse aus (11). Aufgrund der avaskulären Nährstoffversorgung der Knorpelzellen generieren die Chondrozyten den Großteil ihrer Energie anaerob und der Matrixumsatz verläuft langsam, jedoch stetig (11). In verschiedenen Zonen des hyalinen Knorpels variieren sie in ihrer Form und bilden angesichts ihrer isolierten Lage innerhalb der Knorpelmatrix nur sehr begrenzt interzelluläre Kontakte zur direkten Signalübertragung. Stattdessen übernimmt eine Vielzahl parakrin sezernierter Faktoren, neben biomechanischen Stimuli, die Regulation. So reguliert der Transkriptionsfaktor SOX9 unter anderem die Kondensation von Mesenchymzellen. Proteine der TGF β -(*transforming growth factor beta*)-Superfamilie fördern die Proliferation, während Zytokine der *fibroblast growth factor*-(FGF)-Familie die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten fördern. Diese terminal differenzierten Chondrozyten gehen durch Apoptose zugrunde (12).

1.1.2.1. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix trägt mit ca. 95 % zum Gesamtvolumen des hyalinen Knorpels bei (7). Neben Wasser als Hauptbestandteil der EZM sind alle strukturgebenden Anteile aus Faserproteinen, wie Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen aufgebaut (12). Der konkrete Aufbau ist von der Matrixzone des Knorpels abhängig. Die perizelluläre, territoriale und die interterritoriale Matrix unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bestandteile.

Mit ca. 60 % sind fibrilläre Kollagene, vor allem Kollagen-Typ II, bestimmend für die extrazelluläre Matrix. Aber auch andere Kollagen-Typen, wie Typ VI, IX, X und XI, haben ihre spezifische Verteilung und Funktion (10; 13). Der Kollagen-Typ II ist, wie

alle fibrillären Kollagene, durch eine Tripelhelix-Struktur charakterisiert. Die zunächst intrazellulär synthetisierten Moleküle werden anschließend extrazellulär quervernetzt, um die Stabilität gegen Scher- und Zugkräfte zu gewährleisten. Die quervernetzten Mikrofibrillen bilden mit anderen Kollagen-Typen heterotypische Fibrillen (2; 12). Darüber hinaus lagern sich nicht-fibrilläre Kollagentypen, wie das FACIT (*fibril associated collagens with interrupted triple helices*)-Kollagen IX in die Fibrillen ein, welches aufgrund einer Chondroitinsulfat-Seitenkette zur hydrophilen Oberfläche der Fibrillen beiträgt. Einzigartig für hypertrophe Chondrozyten ist die Expression von Kollagen X. Es bildet hexagonale Netzwerke und fördert die enchondrale Ossifikation. Insgesamt macht es 1 % der gesamten Kollagene aus (10).

Ein weiterer integraler Bestandteil der EZM sind Proteoglykane, die in den meisten Fällen mit Glykosaminoglykanen, wie z.B. Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfat (12; 14) kovalent modifiziert sind. Letztere sind als Polysaccharide polyanionisch und durch Sulfatierung zusätzlich negativ geladen. Dies führt zu einem kolloid-osmotischen Druckgradienten, wodurch Wasser in der EZM gespeichert wird. Das am häufigsten vorkommende Proteoglykan des Knorpelgewebes ist Aggrecan. Es ist mit einer hohen Zahl Seitenketten bestückt und bildet durch Anlagerung an Hyaluronsäure großflächige Aggregate und schafft so die Grundlage für die Druckbelastbarkeit des Knorpels. Kleine Proteoglykane wie das Decorin fungieren als Organisator des Matrixnetzwerkes, modulieren Kollagene und verhindern die Fusion von Fibrillen. Membrangebundene Proteoglykane hingegen, wie z.B. die Integrine, dienen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und fungieren unter anderem als Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren (12; 14; 8).

1.2. Apoptose

Apoptose als eine Form des Zelltodes bezeichnet den kontrollierten Zerfall und Abbau nicht notwendiger oder geschädigter Zellen und wurde 1972 durch Kerr et al. erstmals beschreiben (15). Durch Kondensation und Fragmentierung der Zellorganellen und des -kerns entstandene Partikel werden direkt von Makrophagen und Granulozyten aufgenommen und dadurch eine immunologische Reaktion umgangen (5). Ausgelöst wird die Apoptose entweder über einen extrinsischen oder einen intrinsischen Signalweg. Der extrinsische Signalweg führt durch Bindung extrazellulärer Signale,

wie Tumornekrosefaktoren (TNF), an membranständigen Rezeptoren zur intrazellulären Bildung eines *death-inducing signaling complex* (DISC). Der DISC setzt durch Autokatalyse die enzymatische Caspase-8 frei, welche wiederum Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) aktiviert. Die Effektorcaspasen zerstören lebenswichtige Proteinstrukturen und bewirken so den Zelluntergang (12). Der intrinsische Weg ist vor allem durch Schädigung der Mitochondrienmembran gekennzeichnet. Durch die folgende Freisetzung proapoptotischer Proteine kommt es zur Bildung eines Apoptosoms, welches wiederum über Caspase-9 Effektorcaspasen aktiviert (12).

1.2.1. Bedeutung der Apoptose für Chondrozyten

Als gering metabolisch aktive Zellen sind Chondrozyten besonders von den Folgen der Apoptose betroffen. Ihr Überleben hängt u.a. von parakrinen Faktoren und Zellinteraktionen ab (16). Der Verlust dieser Matrixinteraktionen konnte als Auslöser von Apoptose in diversen Zelltypen nachgewiesen werden (17). Im Besonderen wurde eine Beteiligung der Apoptose bei der Pathophysiologie der Arthrose häufig diskutiert. Dabei ist nicht abschließend geklärt, ob ein kausaler Zusammenhang besteht oder nur eine Korrelation (18; 19). Die Ursachen für den Zelluntergang sind vielfältig und komplexe Signalwege aktivieren beide genannten Apoptosewege. Darüber hinaus wurde bei Chondrozyten ein weiterer Mechanismus beobachtet. Abweichend von der klassischen Apoptose, ist bei der sogenannten Chondroptose eine gesteigerte Proteinsynthese mit Anwachsen des endoplasmatischen Retikulums ursächlich für die Fragmentierung der Zelle und Zerstörung der Organellen (20). So werden Apoptosepartikel vermieden, da phagozytierende Zellen im avaskulären Knorpelgewebe kaum vorhanden sind.

1.3. Ausgewählte Erkrankungen des Gelenkknorpels und Therapieoptionen

1.3.1 Arthrose

Arthrose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Im Jahr 2019 lebten rund 528 Millionen erkrankte Menschen (21). Dabei ist ein deutlicher Anstieg von über 110 % im Vergleich zum Jahr 1990 zu verzeichnen (21; 22). Als degenerative Gelenkerkrankung zeichnet sich die Arthrose durch progredienten Verlust des

Gelenkknorpels aus. Es sind alle Gelenke betroffen, jedoch treten die Beschwerden in Knien, Hüften oder Händen am häufigsten auf. Durch den Funktionsverlust des vor axialen Kräfteinwirkungen schützenden Knorpels kollidieren die Knochen des Gelenks miteinander und verursachen Reibung. Die resultierende Immunreaktion verursacht Schwellung und Schmerzen, sowie im Verlauf eine zunehmende Steifigkeit, welche zu Funktionseinschränkungen im Alltag führt (23). Als ursächlich wird ein Missverhältnis der mechanischen Beanspruchung und der Resistenz des hyalinen Gelenkknorpels angesehen. Dem initialen Aggrecanverlust folgt eine Demaskierung der Kollagenfibrillen, welche anschließend dem Abbau durch Proteasen ausgesetzt sind. Zudem werden Glykosaminoglykan-Seitenketten abgebaut, wodurch die Wasserbindungskapazität herabgesetzt wird. Der instabile Knorpel wird abgerieben und die Chondrozyten differenzieren durch die Veränderungen zu Osteoblasten oder beginnen die Apoptose (24). Neben der primären Arthrose treten die genannten Veränderungen auch sekundär in der Folge traumatischer Gelenkdefekte, ischämischer (z.B. aseptische Knochennekrosen) oder endokrin-metabolischer Ursachen (z.B. Gicht, Chondrokalzinose, Diabetes mellitus) auf (24).

Die Arthrose weist im Alter eine steigende Prävalenz auf und verursacht zusammen mit anderen muskuloskelettalen Erkrankungen bereits in den 1990er Jahren Behandlungskosten in Höhe von 1 – 2,5 % des Bruttoinlandsproduktes führender Industrienationen (25). So stehen die Prävention und ein früher Behandlungsbeginn im Fokus, um die wachsende sozioökonomische Last zu senken. Behandlungsoptionen sind dabei medikamentöse Ansätze, individuelle Verfahren wie Lebensstiländerung oder Physiotherapie, sowie chirurgische Interventionen (26; 27). In der pharmakologischen Therapie sind vor allem nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) verbreitet, wobei zunächst Paracetamol vor anderen Vertretern eingenommen werden sollte. Aber auch andere Pharmaka, ‚*Disease Modifying Drugs for Osteoarthritis*‘ (DMOADs) oder Glukokortikoide, werden oral oder als intraartikuläre Injektionen eingesetzt (27). Weitere konservative Therapieoptionen umfassen aktives Training, Gewichtsreduktion über Lebensstiländerung, Physio- oder physikalische Therapie.

Für die chirurgische Behandlung der Arthrose stehen vielfältige Methoden zur Verfügung. Neben den etablierten Methoden, welche von Umstellungsosteotomien in frühen Arthrose-Stadien bis zu endoprothetischen Gelenkersatzverfahren und

Arthrodesen reichen (23), gibt es auch Ansätze den Knorpel selbst zu erhalten oder zu ersetzen. Diese „Hot Topics“ der translationalen Medizin umfassen Mikrofrakturierung, autologe Chondrozytenimplantation (28; 29), matrix-gestützte Implantation (30) oder die Implantation von mittels Tissue Engineering gewonnenen Gelenkknorpel (31; 32). Ziel der Mikrofrakturierung ist die Anregung der körpereigenen Knorpelregeneration über das Einfließen von Stammzellen durch Anbohrung der Gelenkfläche. Dadurch wird Faserknorpel gebildet, der zwar nicht die vollen Eigenschaften von hyalinem Gelenkknorpel hat, jedoch die Progression der Arthrose aufhält (33). Bei der autologen Chondrozytenimplantation hingegen wird nach initialer Entnahme und Anzucht von Chondrozyten ein bestehender Defekt in einer zweiten Operation aufgefüllt, wodurch ein dem hyalinen Knorpel deutlich ähnlicheres Ersatzgewebe entsteht. Erstbeschreiber dieser Methode sind Brittberg et al. (34).

1.3.2. Aseptische Knochennekrosen und Osteochondrosis dissecans

Eine weitere Ursache für Defekte der Gelenkknorpelfläche ist die aseptische Knochennekrose, mit der Osteochondrosis dissecans als Sonderform. Hierbei kommt es nach einem ischämischen Ereignis zur Bildung eines Nekroseareals im Knochen, welches durch immunologische Prozesse zur Sklerose führt. Ebenso besteht die Möglichkeit zur Restitutio ad integrum. Obwohl die Knorpeloberfläche selbst anfänglich intakt ist, dünnt diese im Verlauf aus und das betroffene Areal lockert sich, wodurch es sich aus dem Knochen herauslösen kann. Wenn sich das Dissektat vollständig löst, bleibt der von Knorpel unbedeckte Knochen als Defektzone zurück (23).

Bei den Therapieoptionen finden sich Überschneidungen zur Arthrose. Vordergründig in der Behandlung ist der Erhalt der Gelenkfläche. Ein intaktes Dissektat kann mittels Klebverfahren oder resorbierbaren Stiften refixiert werden. Die unter 1.2.1. genannten Knorpelersatzverfahren finden Verwendung, wenn das Dissektat nicht mehr geborgen oder befestigt werden kann. Insbesondere die Chondrozytenimplantation wird genutzt (23).

1.4. Knorpelbiologie und Mikrogravitation

1.4.1. Definition von Schwerkraftbegriffen

Gravitation selbst beschreibt die Anziehung aller Materie und lässt sich gemäß Newton als Naturgesetz wie folgt beschreiben:

$$|\vec{F}_G| = G \times \frac{m_1 m_2}{r^2}$$

F = Gravitationskraft, G = Gravitationskonstante, $m_{1,2}$ = Massen, r = Abstand

Die Gravitationskraft $|\vec{F}_G|$ auf der Erde ist $m \times 9,81 \text{ N / kg}$ und entspricht der Fallbeschleunigung g . Wirken auf einen Körper zusätzliche Beschleunigungen, wächst die Kraft und man spricht von "Hypergravitation" oder "Hyper-g".

Schwereelosigkeit ist nicht die Abwesenheit der Gravitationskraft, sondern der Zustand, in dem sie für den Körper nicht spürbar ist (35). Da die Gravitationskraft auf der Erde nicht vollständig überwunden werden kann, wird Schwerelosigkeit auf der Erde nur simuliert. Dieser Zustand wird durch die Lageänderung des Körpers zum Schwerkraftvektor und daher nur „aus Sicht des Körpers“ erzielt. Summieren sich alle gewichtsabhängigen Beschleunigungen auf einen minimalen Rest, spricht man von Mikrogravitation (μg) oder simulierter Mikrogravitation (s- μg). Diese erreicht meist 10^{-5} - $10^{-6} g$ (36).

1.4.2. Einfluss von Mikrogravitation auf Knorpelgewebe

Das Leben auf der Erde hat sich unter den Bedingungen der Schwerkraft entwickelt und evolutionär an die Gegebenheiten angepasst (37). Daher stellen uns Bedingungen mit verstärkter oder abgeschwächter Gravitation vor besondere Herausforderungen.

Die *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) definiert fünf große Gefährdungen durch Raumfahrt: Strahlung, Gravitationsunterschiede, Isolation und stark beengter Lebensraum, die Entfernung von der Erde, sowie feindselige Umgebungen (38). Im Besonderen sind die ersten beiden Punkte für die Gewebe des Stützapparates, wie Knorpelgewebe, von Bedeutung. Neben dem kanzerogenen Effekt von (langfristigem) Einfluss von Strahlung sind auch andere degenerative

Effekte beschrieben. Diese gehen unter anderem auf DNA-Schäden, Beeinflussung der Epigenetik und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zurück, welche zu vermehrter Apoptose führen können. Diese Einflüsse betreffen den Knorpel nur sekundär, vorrangig sind kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Beeinträchtigungen (39).

Die Gravitationsunterschiede führen ihrerseits zu Wechselwirkungen mit Gravisensoren, Körperflüssigkeiten und gewichtstragenden Strukturen. So lässt sich eine Abnahme der Knochendichte bis zu 20 % nachweisen (40). In Untersuchungen von Astronauten der Internationalen Raumstation (ISS) konnte die Degradation von Knorpelgewebe anhand von Arthrose-Biomarkern im Blutserum und Urin während und nach den Missionen nachgewiesen werden. Teilweise zeigten sich noch ein Jahr später chondrolytische Markerproteine im Urin (41). Ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Einflüsse von Weltraummissionen auf der Erde sind *head down tilt bed-rest* Studien. Hierbei liegen Probanden über einen gewissen Zeitraum auf dem Rücken in einem 6° kopfwärts geneigten Bett. Dadurch wird der Schwerkraftvektor egalisiert und die Fluidodynamik unter Mikrogravitation simuliert. In diesen Studien zeigte sich in der Magnetresonanztomografie eine reduzierte Knorpeldicke und eine Abnahme von mechano-sensitiven Biomarkern (41).

1.5. Tissue Engineering

Tissue Engineering beschreibt die Kombination von Biomaterialien, Zellen und Trägersubstanzen mit Hilfe von Methoden aus den Lebens- und Ingenieurwissenschaften. Dabei ist das Ziel, funktionelles Gewebe oder ganze Organe zu erzeugen. Als Forschungsgebiet ist die Methode seit den 1960er Jahren bekannt (42). Neuere Entwicklungen bringen neben der Biofabrikation, auch biologische dreidimensionale (3D)-Druck-Technologien (Bioprinting) in den Fokus. Dabei sind im Besonderen für Knorpelgewebe zahlreiche Bioprinting-Methoden bekannt und Bioreaktoren für das Tissue Engineering verfügbar (43). Diese Technologien befinden sich teils in frühen Entwicklungsstadien und sind daher teuer. Ethische und klinische Anwendungsfragen müssen noch abschließend geklärt werden. Trotzdem bieten sie Möglichkeiten Knorpeldefekte aufgrund der oben genannten Krankheiten zu reparieren (44–46).

1.5.1. Bioreaktoren zur Simulation von Mikrogravitation

Die Erforschung der Einflüsse und Auswirkungen von Mikrogravitation ist wichtig für das Verständnis sämtlicher schwerkraftabhängiger Prozesse. Jedoch sind Experimente in realer Schwerelosigkeit rar und teuer. Daher bieten Bioreaktoren, welche Mikrogravitation simulieren, eine günstige und häufig genutzte Alternative (47). Hierbei werden zweidimensionale von dreidimensionalen Reaktoren unterschieden.

Der Klinostat (Abbildung 2A) nutzt die Rotation um eine horizontale und zur Erdgravitation senkrecht gerichtete Achse. Eine kontinuierliche, schnelle Rotation verursacht eine fortlaufende Änderung der Ausrichtung des Schwerkraftvektors, der sich über die Zeit zu einem Betrag von annähernd 0 g aufsummiert. Zur Vermeidung von Zentrifugalkräften ist die Probe nahe dem oder im Rotationsmittelpunkt der Drehachse positioniert. So kann im Bezugssystem der Probe eine apparente Reduktion der Gravitation erreicht werden (48). Die *Random Positioning Machine* (RPM; Abbildung 2 B) ist ein auf dem Prinzip des Klinostaten basierender Reaktor, welcher die Rotation um zwei unabhängig agierende Achsen ermöglicht und so dreidimensional wirkt. Die Achsen werden software-gestützt mit zufällig ermittelten Rotationsgeschwindigkeiten bewegt. Die Richtung der Bewegung erfolgt ebenso randomisiert. Dadurch werden Beschleunigungen zwischen -1 und +1 g erreicht (49).

Ein anderer häufig verwendeter Bioreaktortyp ist der von der NASA entworfene *Rotating Wall Vessel* (RWV)-Bioreaktor (50–52). Die Zellkultur-Vessel rotiert bei diesem Reaktor um ihr eigenes Zentrum. Die Zellen befinden sich in Suspension und in einem konstanten freien Fall. Der Gravitationsvektor wird durch die dynamischen Beschleunigungen, welche in der Flüssigkeit wirken, aufgehoben und dadurch für die Zellen Mikrogravitation simuliert. Gleichzeitig wird die Sedimentation verhindert (Abbildung 2C – D). Im Vergleich zu anderen axial-rotierenden Bioreaktoren werden Scherkräfte und Turbulenzen im Medium reduziert (53). Besonders die von D. Wolf und R. Schwartz 1992 entworfene high-aspect-ratio rotating cell-culture vessel (HARV-RCCD) bietet sehr gute Bedingungen, da die Rückwand der Vessel eine Membran aufweist, welche den Gasaustausch ermöglicht (54; 55) und durch die horizontale Orientierung der Aufhängung der Vessel die Proliferationsrate der Zellen erhöht ist (56). Zur Optimierung der Rotationsgeschwindigkeit erfolgt die Steuerung über ein externes Kontrollgerät.

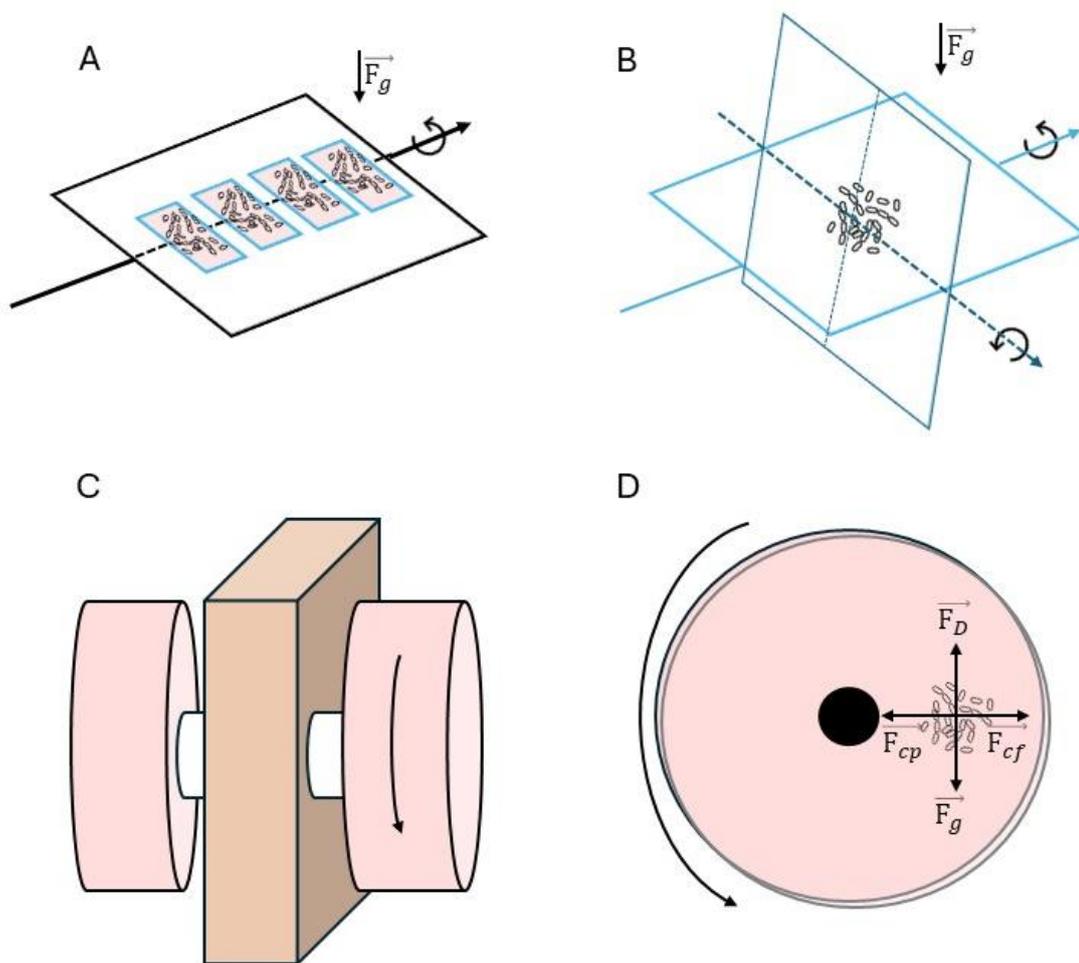


Abbildung 2 - Schematische Darstellung der beschriebenen Reaktoren für die Simulation von Mikrogravitation. (A) stellt einen Klinostaten, (B) eine RPM dar. (C – D) veranschaulichen eine RWV, wobei (D) grob die auf die Zellen wirkenden Kräfte skizziert. \vec{F}_g = Schwerkraftvektor, \vec{F}_D = hydrodynamische Beschleunigung, \vec{F}_{cp} = Zentripetalkraft, \vec{F}_{cf} = Zentrifugalkraft.

1.5.2. Nutzung von (simulierter) Mikrogravitation für das Tissue Engineering

Zellen, die während der Kultivierung Mikrogravitation ausgesetzt sind, werden divers beeinflusst. In zahlreichen Versuchen konnten zelluläre Veränderungen und Prozesse beobachtet werden, welche unter normaler Gravitation nicht nachweisbar sind. Vor allem die Bildung von dreidimensionalen Zellaggregaten ohne Vorhandensein eines Trägergerüsts ist für das Tissue Engineering von hervorgehobener Relevanz (57). In Zellkulturen wird die Bildung dieser sogenannten Sphäroide durch Mikrogravitation ausgelöst und kann unter realer und simulierter Schwerelosigkeit beobachtet werden. Bei unterschiedlichen Zellarten lassen sich unter diesen Bedingungen Veränderungen

bei der Differenzierung, Proliferation, Wachstums- und Migrationsverhalten, sowie der Konstitution des Zytoskeletts, der EZM oder anderen Strukturen bemerken (58). Dreidimensionale Aggregation wurde bei endothelialen Zellen, verschiedenen malignen Zellen und Chondrozyten im Weltall (59–61), auf der RWV (62; 63) oder auf der RPM (64; 65) nachgewiesen.

Eine kurzfristige Kultivierung von Chondrozyten in simulierter Mikrogravitation verursacht auf Gen-Ebene Veränderungen bezüglich Zellstruktur, -motilität, Zytoskelett, Wachstum, Differenzierung und Zelltod (66). Nach längerfristiger Kultivierung der Chondrozyten auf der RPM formten diese nach 5 Tagen ohne Trägermaterialien 3D-Sphäroide und nach 4 Wochen knorpelige Gewebestücke mit bis zu 2 mm Durchmesser (65).

Auch auf der RWV konnten entsprechende Erfolge für das Tissue Engineering erzielt werden. So konnte an bovinen Chondrozyten eine Differenzierung unter Nutzung von Cytodex-3 Beads als Trägermaterial nach 36 Tagen RWV Exposition gezeigt werden. Bei statischen Kontrollen dagegen trat nur eine geringe Differenzierung auf (67). Auch auf anderen Trägermaterialien ließ sich bis zu 9 Tage nach Beginn des Experiments keine Veränderung der Morphologie und Genexpression an primären Chondrozyten nachweisen (68). Darüber hinaus konnten Chondrozyten auch ohne Trägermaterial unter RWV-Bedingungen kultiviert werden. Dabei zeigte eine langfristige Kultivierung von bereits dedifferenzierten Chondrozyten sogar eine erneute Differenzierung und Wiedergewinn der charakteristischen Morphologie und Matrixproduktion (69; 70).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll das dreidimensionale Wachstum und die Bildung von Knorpelgewebe aus unterschiedlichen Chondrozyten untersucht werden. Hierbei soll das Tissue Engineering durch Stimulation von primären humanen, immortalisierten humanen, sowie murinen Chondrozyten mittels RWV realisiert werden. Auf Trägermaterialien wird verzichtet. Die Dauer der Experimente umfasst drei bis 14 Tage. Der Nachweis von knorpeltypischen EZM-Komponenten erfolgt makro- und mikroskopisch durch histologische und immunhistochemische Verfahren. Darüber hinaus werden Veränderungen der Genexpression im Vergleich zu einer statischen Kontrollgruppe untersucht.

Das übergeordnete Ziel dieser Dissertation besteht darin, die von der simulierten Mikrogravitation abhängige Knorpelsynthese anhand unterschiedlicher Zelltypen nachzuweisen, und so die Validität der Methode zu festigen. Es soll evaluiert werden, inwiefern sich zelltypunabhängige Veränderungen der Protein- und Genexpression nachweisen lassen.

Es ist die Hypothese zu prüfen, dass die Bedingungen der simulierten Mikrogravitation, die durch eine ‚*Rotating Wall Vessel*‘ erzielt wurden, dreidimensionales Wachstum von Chondrozyten induzieren und daher zur Bildung von Knorpelgewebe führen. Es wird angenommen, dass durch simulierte Mikrogravitation die Proliferation und Differenzierung der Knorpelzellen angeregt und gesteigert werden. Infolgedessen wird die Bildung charakteristischer extrazellulärer Matrix erhöht. Intrazelluläre Signalwege, welche dies bedingen und in allen untersuchten Zellreihen übereinstimmen, sollen identifiziert und dargestellt werden. Diese können für die Weiterentwicklung des Tissue Engineerings von Knorpel gezielt genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

In den Versuchen werden humane und murine Chondrozyten verwendet. Als humane Chondrozyten werden zum einen kommerziell erworbene primäre Zellen der Firma Provitro (Berlin) kultiviert und genutzt. Zum anderen finden immortalisierte Zellen Verwendung. Letztere stammen ursprünglich aus sternalem Knorpelgewebe und wurden mittels des SV40 large T Antigen unter Nutzung von retroviralen „neomycin-resistant“ pZipNeoSV(X) Vektoren immortalisiert (71). Diese wurden dem Arbeitsbereich durch Professor Mary Goldring zur Verfügung gestellt.

Murine Chondrozyten wurden aus den Knien von C57BL/6J Mäusen isoliert und kultiviert. Dies fand als Organentnahme statt, Tierexperimente wurden nicht durchgeführt. Die Methodik ist unter 2.2.1.2. genauer beschrieben.

2.1.2. Geräte und Software

Tabelle 1 - verwendete Geräte und Software

Gerät / Bezeichnung	Bezugsnachweis
Axio Observer (Kamera: AxioCam 702 mono, Lampe: HXP 120V)	Carl Zeiss AG, Jena
Bildanalysesoftware „Image J“	US Nat. Inst. Of Health, Bethesda, MD, USA
Einbettstation Shandon Histo Centre 2	GMI Inc., Ramsey, MN, USA
Entwässerungsautomat TP1020	Leica Biosystems, Nussloch
Gefrierschrank -150°C „MDF-1156“	Panasonic, Osaka, JP
Gefrierschrank -20°C „Comfort GP 2433“	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C „MDF-U76VC“	Sanyo, Osaka, JP
Heraeus, Megafuge 16R	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
Infinite F200 Pro Software	TECAN, Crailsheim
Inkubationsschrank	Binder GmbH, Tuttlingen

Kreisschüttler „SSM1 Mini Orbital Shaker“	Stuart, Stone, UK
Kühlschrank „Comfort KT 1630“	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Mikroliterpipetten (1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf GmbH, Leipzig
Mikrotom Hyrax M55	Carl Zeiss AG, Jena
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Nanoquant Platte	TECAN, Crailsheim
QuantStudio 3 PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Rotary Cell Culture System (RWV)	Synthecon Inc., Houston, TX, USA
Sterilbank „NU-440-401-E“	NuAire, Plymouth, MN, USA
T100 Thermal cycler	BioRad, Shinagawa, Tokyo, JPN
Trockenschrank UM200	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortex „Reax Top“	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 - verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsnachweis
Biopsie-Einbettkassetten	Simport Scientific Inc., Beloeil, QC, CAN
DakoPen	Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA
Deckgläser, 24x48mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Gefäße 1-50mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
High Aspect Ratio Vessels für die RWV	Synthecon Inc., Houston, TX, USA
high-capacity cDNA reverse transcription Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
In Situ Cell Death TMR kit	Merck KGaA, Darmstadt
Mikroliterpipettenspitzen (1 - 1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Objektträger, 25x75mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmBbH, Hilden
Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Zellkulturflaschen (25, 75 oder 175 cm ²)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht

2.1.4. Chemikalien

Tabelle 3 - verwendete Chemikalien

Substanz	Bezugsnachweis
bovines Serum-Albumin, Fraktion V, 4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chondrocyte Growth Medium (CMG)	Provitro, Berlin
Citratpuffer, pH 9	Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA
Collagenase D, Typ 4	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA
DMEM High Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eosin-G-Lösung, 0,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, vers. Konzentrationen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum, 10 %	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanadabalsam	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat, 1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumthiosulfat, 5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin, 100 IU/ml	Biochrom, Berlin
Streptomycin, 100 µg/ml	
Pronase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyrogallolsäure, 1 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RNAlater	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rnase away Spray	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ROTI-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Safranin-Orange	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure, rauchend 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Saures Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Silbernitrat, 5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sirius Rot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Waschpuffer	Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.5. Antikörper und qPCR-Primer

Die Tabelle 4 bietet einen Überblick über die verwendeten Antikörper. Primäre Antikörper sind dabei oben gelistet, gefolgt von sekundären Antikörpern.

Die Tabelle 5 stellt die für die qPCR verwendeten Primersequenzen dar. Alle Sequenzen sind in 5' - 3' Richtung notiert.

Tabelle 4 - verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsnachweis
Anti-COL1A1	1:500	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
Anti-COL2A1	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Anti-COL10A1	1:150	Abcam, Cambridge, UK
Iso-rabbit	1:2500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-rabbit Alexa 555	1:200	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 5 - qPCR Primersequenzen

Gene	Primernamen	Primersequenz
18S rRNA	18S-F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	18S-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
ACAN	ACAN-F	TTCTGCTTCCGAGGTGTGTC
	ACAN-R	CCACCTGAGTGACGATCCAG
ACTB	ACTB-F	TGCCGACAGGATGCAGAAG
	ACTB-R	GCCGATCCACACGGAGTACT

<i>CASP3</i>	CASP3-F	AACTGCTCCTTTTGCTGTGATCT
	CASP3-R	GCAGCAAACCTCAGGGAAAC
<i>CASP8</i>	CASP8-F	TGCAAAAGCACGGGAGAAAG
	CASP8-R	CTCTTCAAAGGTCGTGGTCAAAG
<i>COL1A1</i>	COL1A1-F	ACGAAGACATCCCACCAATCAC
	COL1A1-R	CGTTGTGCGCAGACGCAGAT
<i>COL2A1</i>	COL2A1-F	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
	COL2A1-R	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>COL10A1</i>	COL10-F	GGGCAGAGGAAGCTTCAGAAA
	COL10-R	TCTCAGATGGATTCTGCGTGC
<i>CXCL8</i>	CXCL8-F	TGGCAGCCTTCCTGATTTCT
	CXCL8-R	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
<i>IL6</i>	IL6-F	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA
	IL6-R	GAGCAGCCCCAGGGAGAA
<i>ITGB1</i>	ITGB1-F	GAAAACAGCGCATATCTGGAAATT
	ITGB1-R	CAGCCAATCAGTGATCCACAA
<i>LAMA1</i>	LAMA1-F	TGACTGACCTGGGTTTCAGGA
	LAMA1-R	TGCTAGCACTCCTTGCTTCC
<i>MMP1</i>	MMP1-F	GTCAGGGGAGATCATCGGG
	MMP1-R	GAGCATCCCCTCCAATACCTG
<i>MMP3</i>	MMP3-F	ACAAAGGATACAACAGGGACCAA
	MMP3-R	TAGAGTGGGTACATCAAAGCTTCAGT
<i>MMP13</i>	MMP13-F	GGAGCCCTGATGTTTCCCAT
	MMP13-R	GTCTTCATCGCCTGGACCATA
<i>PRG4</i>	PRG4-F	CCCCCAAACCACCAGTTGTA
	PRG4-R	ACGTGTCAGGAGTTGTGACC
<i>RUNX2</i>	RUX2-F	TGATGACACTGCCACCTCTG
	RUNX2-R	CCAGTTCTGAAGCACCTGCC
<i>RUNX3</i>	RUNX3-F	GTGGGCGAGGGAAGAGTTTC
	RUNX3-R	CCTTGATGGCTCGGTGGTAG
<i>SOD3</i>	SOD3-F	CTGGAAAGGTGCCCGACTCC
	SOD3-R	ATGTCTCGGATCCACTCCGC

SOX6	SOX6-F	GCCACACATTAAGCG
	SOX6-R	TCCAGCGAGATCCTAAGATTTTG
SOX9	SOX9-F	AGGAAGTCGGTGAAGAACGG
	SOX9-R	CGCCTTGAAGATGGCGTTG
SPP1	SPP1-F	CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGA
	SPP1-R	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG
TGFB1	TGFB1-F	CACCCGCGTGCTAATGGT
	TGFB1-R	AGAGCAACACGGGTTTCAGGTA
TUBB	TUBB-F	CTGGACCGCATCTCTGTGTACTAC
	TUBB-R	GACCTGAGCGAACAGAGTCCAT
VIM	VIM-F	TTCAGAGAGAGGAAGCCGAAAAC
	VIM-R	AGATTCCACTTTGCGTTCAAGGT

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturen

2.2.1.1. Anzucht humaner Chondrozyten

Zur Anzucht der für das Experiment notwendigen humanen Chondrozyten wurden die unter 2.1.1. genannten Zelllinien verwendet. Diese wurden jeweils unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank angezüchtet, mit neuem Medium versorgt, subkultiviert oder für die Experimente vorbereitet.

Als Zellkulturmedium für die C28/I2 Zelllinie (fortan C28 genannt) wurden 500 ml DMEM High Glucose, 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden aus der Tiefkühl Aufbewahrung entnommen und jeweils in eine konventionelle T175 Zellkulturflasche überführt. Zunächst erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ über 3 Tage. Der Grad der Konfluenz wurde durch Lichtmikroskopie vor jedem Passagiervorgang kontrolliert und eine Konfluenz von über 75 % angestrebt. Nach sorgfältigem Entfernen des Mediums und Waschen der Zellen mit 10 ml PBS (Phosphate-buffered saline) Puffer wurden die Zellen mittels Hinzugabe von 2 ml Trypsin (0,05 %) und 5-minütiger Inkubationszeit enzymatisch vom Flaschenboden gelöst. Die gewonnene Suspension wurde in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das

entstandene Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf drei weitere T175 Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Für die Anzucht der primären humanen Chondrozyten (fortan hCHON genannt) wurde ein ähnliches Protokoll genutzt. Zur Herstellung des Zellmediums wurde CGM-Medium die gleiche Menge fetalen Kälberserums und Antibiotika zugesetzt wie oben genannt. Für die erste Passage wurden die kommerziell erhältlichen Zellen in einer Konzentration von 10.000 Zellen/cm² in T25-Kulturflaschen ausgesät und dreifach in T75-Kulturflaschen passagiert.

Das Kulturmedium wurde für beide Zelllinien alle 3 Tage vollständig ausgetauscht.

2.2.1.2. Gewinnung und Anzucht muriner Chondrozyten

Zur Gewinnung muriner Chondrozyten (fortan mCH genannt) wurden drei Tage alte Mäuse (vgl. 2.1.1.) präpariert. Hierfür erfolgte die Tötung durch Dekapitation. Es folgte die Freilegung der Knie durch Inzision des Oberschenkels und stumpfer Präparation der Muskulatur mit einer Schere. Mit dieser wurden das Femur distal abgesetzt und die Tibia proximal durchtrennt. Anschließend erfolgte die Resektion von Geweberesten. Die gewonnenen Knieresektate wurden in eine 12-well-Platte gegeben und 2 ml Kollagenase-Lösung hinzugefügt. Diese bestand aus 3 mg/ml Kollagenase D, Typ 4, welche mit DMEM-Medium verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 45 – 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Lösung abpipettiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 2 ml einer 1:6 Verdünnung der Kollagenase-Lösung beigefügt und die Platte über Nacht unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde der Inhalt jeder Vertiefung durch repetitives Auf- und Abpipettieren zerkleinert und anschließend mit einem Zellsieb unter Zentrifugation bei 400 g für 10 Minuten die Chondrozyten von überschüssigem Geweberesten getrennt. Die initiale Kultivierung erfolgte in 6-Well-Platten. Nach Erreichen der Konfluenz folgte dann der Transfer in T25-Kulturflaschen nach dem unter 2.2.1.1. beschriebenen Prozedere und anschließend in den Folgepassagen je in T75- und T175-Flaschen. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage vollständig ausgetauscht.

2.2.2. Vorbereitung und Durchführung bodengebundener Mikrogravitationssimulationen

2.2.2.1 Rotating Wall Vessel

Um eine Vergleichbarkeit der Versuchsdurchläufe zu gewährleisten, erfolgte vor dem Befüllen der RWV-Kulturgefäße eine Zellzählung. Hierfür wurde nach Ablösung und Zentrifugation der Zellen ein Aliquot von 1000 µl nach Resuspension weiter verdünnt. Die Zählung erfolgte manuell mittels Hämozytometer unter einem Lichtmikroskop.

Für die C28 Versuche wurden 10^7 Zellen der dritten Passage in je eine RWV Vessel überführt. Die Gefäße wurden mit 50 ml Kulturmedium gefüllt. Dabei wurde sorgfältig auf eine luftblasenfreie Füllung geachtet, um resultierende Scherkräfte zu minimieren (72). Als Vergleichsgruppe diente je eine T175 Kulturflasche, welche mit 5×10^6 Zellen gefüllt wurde. Die gleichen Zellzahlen wurden für die Versuche mit den murinen Chondrozyten genutzt, wobei ebenso die dritte Passage Verwendung fand. Für die hCHON Versuche wurden die dritten und vierten Passagen ausgezählt und 5×10^6 bzw. 12×10^6 Zellen in die Vessels transferiert. Als Kontrollgruppe wurden $0,15 \times 10^6$ Zellen pro Flasche in fünf T75 Kulturflaschen gegeben. Für einen Versuchszeitraum von bis zu 7 Tagen erfolgte kein Mediumwechsel. Für die Versuche von 14 Tagen Dauer wurde nach dem siebten Tag die Hälfte des Mediums entnommen und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Nach der initialen Füllung der Kulturgefäße wurde die RWV zunächst mit einer Geschwindigkeit von 13 rpm gestartet (Abbildung 3). Die immortalisierte Zelllinie und die murinen Chondrozyten wurden nach 48 h auf 20 rpm beschleunigt. Für die Versuchsreihe der hCHON Zelllinie wurde die Rotationsgeschwindigkeit lediglich auf 14,8 rpm erhöht.

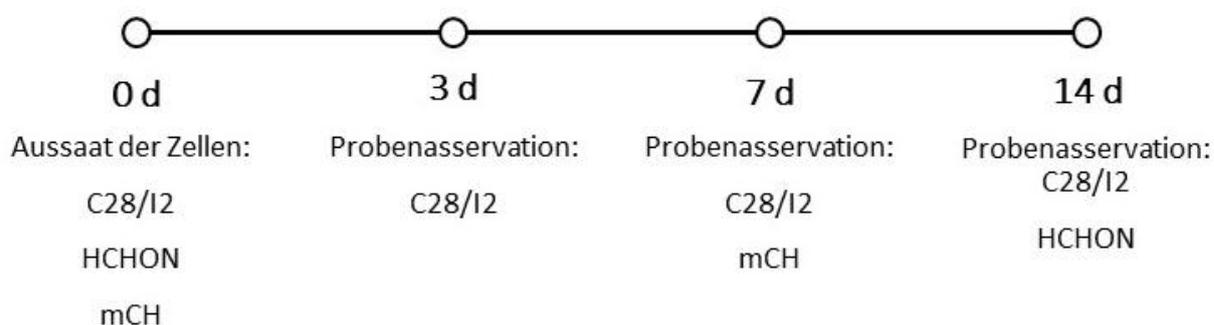
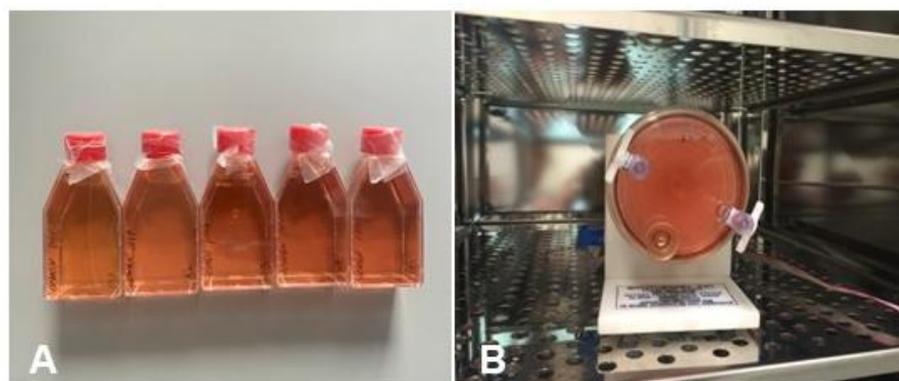


Abbildung 3: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaues anhand der hCHON Zellreihe, Quelle: Steinwerth et al. (2023) (73), sowie Schema des zeitlichen Aufbaus der gesamten Versuchsreihe.

Nach Abschluss des Versuchszeitraumes wurde der Inhalt der Vessels in ein 50 ml Zentrifugengefäß gegossen. Ein Teil der entstandenen Sphäroide wurden mit einem stumpfen Löffel in engmaschige Histologie-Kästen übertragen und in 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die übrigen wurden zur weiteren RNA-Analyse mit einer RNA stabilisierenden Lösung (*RNAlater*, Ambion) fixiert. Die Kontrollgruppen wurden nach Entfernen des Mediums und Spülung mit PBS ebenso mit 5 ml *RNAlater* fixiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die adhärennten Chondrozyten gelöst, anschließend wurde die Zellsuspension mit der Pipette in ein 10 ml Röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3. Histologie

Etwa die Hälfte der gezüchteten Sphäroide wurde nach der Fixierung mit Formaldehyd zur weiteren histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet. Hierfür wurde ein kommerzielles Gewebe-Probenvorbereitungsgesetz verwendet. Im Anschluss erfolgte das Schneiden der Paraffinblöcke. Diese wurden gekühlt auf ein Mikrotom gespannt und zunächst mit 10 µm Schichten grob bearbeitet. Die eigentlichen Gewebeproben

wurden in 4 µm dünne Feinschnitte zerteilt, welche auf Glasobjektträger gespannt wurden. Diese Objektträger wurden über Nacht bei 36 °C getrocknet, bevor sie für die Färbungen genutzt werden konnten.

2.2.3.1. Histologische Färbungen – Hämatoxylin-Eosin Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die histologischen Schnitte zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden die Objektträger jeweils 10 Minuten lang vollständig in zwei Xylol-Bäder getaucht. Die Rehydrierung erfolgte daran anknüpfend unter Verwendung einer absteigenden Alkoholreihe. Jeweils 5 Minuten lang wurden die Objektträger mit Schnitten in Lösungen mit 100, 96, 70, 50 Prozent Ethanolgehalt transferiert und abschließend in destilliertes Wasser immersiert. Es folgten anschließend ein sechsminütiges Bad in saurem Hämalaun nach Mayer zum Zwecke der Kernfärbung, die Spülung des Objektträgers unter fließendem Leitungswasser zum Bläuen des Gewebes, ein zweiminütiges Bad in Eosin (95%ig, wässrig) und die Entfernung von Resten der Färbemittel durch destilliertes Wasser. Zur erneuten Dehydrierung der Schnitte wurden diese in eine aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 Minute 70 %, 96 %, zweimal für 3 Minuten 100 %) gegeben und anschließend zweimal je 3 Minuten lang in Xylol getaucht. Abschließend erfolgte das Eindecken der Präparate unter Nutzung von Kanadabalsam, der Verschluss mit einem Deckglas und die Analyse der Gewebe unter einem Lichtmikroskop (74).

2.2.3.2. Sirius Rot – Färbung

Für die Sirius Rot – Färbung wurden histologische Schnitte zunächst, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Nach der Spülung mit destilliertem Wasser folgte ein fünfminütiger Waschschrift in PBS-Puffer. Die Färbung erfolgte anschließend durch das Eintauchen der Objektträger in eine Picrosirius Red – Lösung über eine Stunde. Im Anschluss wurde die Färbung durch 0,01 N Salzsäure über 2 Minuten auf einem Schüttler fixiert und überschüssige Reste mit destilliertem Wasser unter stetigem Schütteln über 5 Minuten abgewaschen. Die Dehydrierung erfolgte wieder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei die Schnitte jeweils 5 Minuten lang in 50, 70, 96 und zweimal in 100 % Ethanol gegeben wurden. Das sich anschließende doppelte Xylolbad erfolgte über 10 Minuten, bevor das Eindecken mit Kanadabalsam

und der Verschluss mit einem Deckglas die Färbung finalisierte. Die Analyse der Gewebe erfolgte unter einem Lichtmikroskop (75–77).

2.2.3.3. von-Kossa/Safranin-O Färbung

Für die von-Kossa/Safranin-O – Färbung wurden histologische Schnitte zunächst, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Für die gezielte Färbung der Gewebeproben wurden diese vor den weiteren Schritten im einem vorrangig 1-Bromopropan enthaltenden Stift (DakoPen) umkreist, um so eine hydrophobe, nicht alkohollösliche Flüssigkeitsbarriere zu erzeugen. In diese Kreise wurde nun eine fünfprozentige Silbernitrat-Lösung geträufelt, die Objektträger in eine mit Aluminiumfolie ausgelegte Schale zur Konzentration von Licht gelegt und über 60 Minuten inkubiert. Nach gründlicher Spülung mit destilliertem Wasser erfolgten die Applikation von einprozentiger Pyrogallolsäure über 3 Minuten, dann eine erneute Spülung und fünfminütige Inkubation mit 5-prozentiger Natriumthiosulfat-Lösung. Überschüssige Färbereste wurden für 10 Minuten unter fließendem Wasser entfernt, bevor die Objektträger 8 Minuten lang in eine 0,1 % Safranin-O-Lösung gegeben wurden. Nachdem diese Lösung abgespült wurde, konnten die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (96 und 100 %) und Xylol dehydriert und mithilfe von Kanadabalsam eingedeckt werden. Die luftdicht mit einem Deckglas verschlossenen Objektträger wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop betrachtet und analysiert (78; 77; 75).

2.2.3.4. Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden die angefertigten Präparate vorerst, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Wie unter 2.2.3.3. beschrieben, folgte eine Umrandung der Gewebeproben mit einem hydrophoben Stift. Die Schnitte wurden in einem Waschpuffer (Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA) 5 Minuten lang gereinigt. Zur Demaskierung der gesuchten Antigene wurden antigenentsprechend verschiedene Verfahren gewählt. Während für die COL1-Färbungen eine 25-minütige Inkubation in einem 96 °C heißen Citratpufferbad (pH 9) erfolgte, wurden die Schnitte für eine COL2- oder COL10-Färbung durch 10-minütige Inkubation in 1 % Trypsin/EDTA bei 37 °C enzymatisch demaskiert. Nach

zwischenzeitlichen Waschschritten mit dem o.g. Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen der Antikörper durch Nutzung einer vierprozentigen BSA-Lösung, welche mindestens 30 Minuten einwirkte, blockiert. Ohne einen weiteren Waschschriff schloss sich die Inkubation der primären Antikörper an. Diese wurden in der Blockierungslösung verdünnt, wobei die Antikörper gegen Collagen-1 1:500, Collagen-2 1:100 und Collagen-10 1:150 verdünnt wurden, und über Nacht bei 4 °C unter Ausschluss von Licht belassen. Am Folgetag wurden den Schnitten nach Aufreinigung im Waschpuffer ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper zugesetzt. Hierbei wurde auf Spezies-Interaktion geachtet und auf einen Alexa 555-markierten IgG-anti-rabbit Antikörper in einer 1:200 Verdünnung zurückgegriffen, welcher für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf den Gewebeproben verblieb. Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers zu detektieren, erfolgte bei allen Schnitten eine Isotypen-Kontrolle mit einem Iso-rabbit Antikörper. Zum Abschluss wurden die Objekte, um eine zusätzliche Kernfärbung zu erreichen, mit ROTI-Mount FluorCare DAPI eindeckt, luftdicht und luftblasenfrei mit einem Deckglas verschlossen und mikroskopisch analysiert (79).

2.2.4. Apoptosedetektion

Um Apoptose in den Proben nachzuweisen, wurden diese, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, entparaffiniert und rehydriert, sowie für 5 Minuten in PBS gewaschen. Für die Detektion wurde die Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (nachfolgend TUNEL genannt) – Methode verwendet und die Schnitte entsprechend des Herstellerprotokolls des verwendeten In Situ Cell Death TMR Kit (Merck KGaA, Darmstadt) bearbeitet. Im Anschluss wurden vergleichbar zu den immunhistochemischen Färbungen ROTI-Mount FluorCare DAPI aufgetragen, die Objektträger luftdicht mit einem Deckglas verschlossen und mikroskopisch untersucht. In den aufgenommenen Bildern wurde unter Nutzung von ImageJ für Windows die Gesamtzellzahl und die Zahl der TUNEL positiven Zellen ermittelt, und daraus der prozentuale Anteil toter bzw. sterbender Zellen errechnet (80; 81).

$$\frac{\text{TUNEL positive Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} * 100$$

2.2.5. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

2.2.5.1. RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation aus den C28- und mCH-Sphäroiden und den korrespondierenden statischen Kontrollen 1 g wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mittels TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Vor Beginn der Arbeiten wurden sämtliche Oberflächen von RNA-Resten gereinigt und steriles Arbeiten kontinuierlich durchgeführt. Die mit RNAlater fixierten Chondrozyten wurden zunächst bei 700 g für 5 Minuten zentrifugiert, bevor das überstehende Reagenz abpipettiert wurde. 1 ml TRIzol wurde hinzugefügt und nach fünfminütiger Inkubationszeit das Pellet durch gründliches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Diese Lösung wurde erneut für 10 Minuten bei 20.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt. 200 µl Chloroform wurden zugegeben, kurz mit einem Vortex gemischt und 15 Minuten auf Eis belassen. Anschließend folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 g, wonach die entstandene wässrige Phase in ein neues Röhrchen transferiert wurde. Es wurden 500 µl gekühltes Isopropanol hinzugefügt, die Probe 20 Minuten lang auf Eis inkubiert und abermals bei 20.000 g 40 Minuten lang zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abdekantieren des Isopropanols wurden 1 ml des eisgekühlten 75 % Ethanol zugegeben und die Probe nach vorsichtigem Resuspendieren des RNA-Pellets bei 20.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Abschließend konnte das Ethanol abgenommen, die RNA kurzzeitig getrocknet und zur weiteren Analyse in 11 µl RNase-freiem Wasser gelöst werden.

Für die RNA-Isolation aus den Sphäroiden der primären humanen Chondrozyten und deren statischen Kontrollen wurden die in RNAlater fixierten Proben zunächst ebenso zentrifugiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte jedoch unter Nutzung eines RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden), wobei den Instruktionen des Herstellers zur Isolation der totalen RNA gefolgt wurde.

2.2.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Qualität und Konzentration der gewonnenen RNA wurde spektrophotometrisch evaluiert. 1 µl der RNA wurde jeweils auf eine Nanoquant Platte gegeben und auf

einem Infinite F200 Pro Mikroplatten-Reader (TECAN Deutschland, Crailsheim, Germany) analysiert. Die Messung erfolgte bei 260 und 280 nm Wellenlänge. Das A260/280-Verhältnis hierbei war immer mindestens 1,5.

2.2.5.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA der hCHON, C28 und mCH Chondrozyten wurde das „high capacity cDNA reverse transcription Kit“ von Applied Biosystems™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Hierbei wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll ein Mastermix angesetzt, welches eine Nukleotidmischung, Primer, eine Reverse Transkriptase, sowie eine Pufferlösung enthielt. 10 µl dieses Mastermixes wurden mit 10 µl RNA-Mix gemischt, wobei das RNA-Mix entsprechend der gemessenen RNA-Konzentration eine Gesamtmenge von 1 µg RNA enthielt. Die Transkription erfolgte im T100 Thermal cycler (BioRad, Shinagawa, Tokyo). Die gewonnene cDNA wurde einmalig im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend in der Tiefkühlung bei -20 °C zur weiteren Analyse aufbewahrt.

2.2.5.4. quantitative Echtzeit PCR

Um die Expression ausgewählter Gene im Probematerial zu untersuchen, wurde die jeweils von C28, von humanen und von murinen Chondrozyten gewonnene cDNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert und mit den Ergebnissen der statischen 1 g Kontrollen verglichen. Hierzu wurde das Applied Biosystems QuantStudio 3 PCR System unter Verwendung des Fast SYBR® Green PCR Master Mix (beide Applied Biosystems, Darmstadt) genutzt. Die Methode beruht auf einem von Heid et al. beschriebenen Verfahren und nutzt fluoreszenz-markierte DNA Amplifikationsmessungen (82). Das Gesamtreaktionsvolumen von 15 µl beinhaltete neben den Nukleotiden, eine AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase und SYBR™ Green I-Farbstoff. Letzterer lagert sich als Marker zwischen DNA-Doppelstränge, womit durch Amplifikation das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Zudem wurden 1 µl zu untersuchende cDNA beigefügt. Die finale Primerkonzentration betrug in den Ansätzen 300 nM. Eine Negativkontrolle erfolgte durch Ersatz der Template cDNA durch Wasser. Die qPCR wurde folgendermaßen programmiert: Einer

Denaturationsphase von 20 s Länge bei 95 °C schlossen sich 40 Zyklen abwechselnder Denaturation für 1 s bei 95°C und 20 s Annealing und Elongation bei 60° an. Zur Untersuchung der Produktreinheit wurde am Ende des PCR-Laufs eine Schmelzkurve mit einem Temperaturgradienten von 0,3 °C/Zyklus von 60 bis 95 °C erzeugt. Die in Triplets gemessenen Werte wurde quantitativ unter Nutzung der vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) ausgewertet (83). Als sogenanntes „*Housekeeping*“-Gen wurde die 18S-rRNA (18-S Untereinheit des ribosomalen Komplexes) zur Normalisierung der Expressionswerte verwendet.

Die verwendeten Primer, die in Tabelle 5 gelistet sind, wurden mittels NCBI Primer Blast (84) so produziert, dass sie selektiv für die generierte cDNA-Proben sind und eine Schmelztemperatur um 60 °C haben. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland).

2.2.6. *STRING Analysis (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, V11.5)*

Unter Nutzung der STRING 12-0 Plattform (85) wurden Interaktionen zwischen den untersuchten Genen, bzw. Proteinen visualisiert. Dabei wurde das jeweilige Protein mit der Identifier des UniProtKB (86) im „multiple proteins“ Formular eingetragen und „Homo sapiens“ als Organismus hinterlegt.

2.2.7. *Statistik*

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm IBM SPSS Statistics 23 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) genutzt. Unterschiede zwischen den Expressionswerten der statischen Kontrollen und der s- μ g Versuchsreihen wurden mittels Mann-Whitney U-Test untersucht, wobei ein Signifikanzniveau von 0,05 verwendet wurde. Standardabweichung und Mittelwerte wurden als relative Werte in Balkendiagrammen aufgetragen. Die murinen Ergebnisse wurden mittels ANOVA Testung statistisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologie der dreidimensionalen Knorpelstrukturen in der RWV

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine RWV benutzt, um ohne Trägermaterial dreidimensionale Knorpelstrukturen zu generieren (Abbildung 4A). In den 14-tägigen Versuchen mit den primären humanen Zellen zeigten die statischen Kontrollen (Abbildung 4B) undifferenzierte, vollständig konfluente Chondrozyten, während die Zellen in der RWV 3D Konstrukte bildeten. Abbildung 4C zeigt die entstandenen 3 – 5 maximal 4 mm messenden, augenscheinlich kompakt gewachsenen Gewebeaggregate.

Dagegen konnten bei den untersuchten C28 Chondrozyten bereits nach drei Tagen RWV Exposition eine Vielzahl kleinster Gewebefragmente beobachtet werden. Nach 7 Tagen waren diese in Anzahl reduziert, jedoch circa 2 – 3 mm groß. Nach 14 Tagen waren die Sphäroide, welche sich makroskopisch rund und als kompakte, wenngleich im Zentrum weniger dichte Gewebekonstrukte darstellten, auf 5 mm im Durchmesser angewachsen (vgl. Abbildung 4D – G). Die 1 g Kontrollen zeigten bereits nach 7 Tagen eine hohe Zelldichte bei zunehmender Rundung der Zellen, welche in den nächsten 7 Tagen der Zellkultur weiter zunahm.

Die murinen Chondrozyten wuchsen unter den Mikrogravitations-Kulturbedingungen, vergleichbar zu den HCHON, binnen 7 Tagen zu dicht und rund erscheinenden Gewebestücken heran (Abbildung 4A). Die Durchmesser erreichten maximal 2 mm.

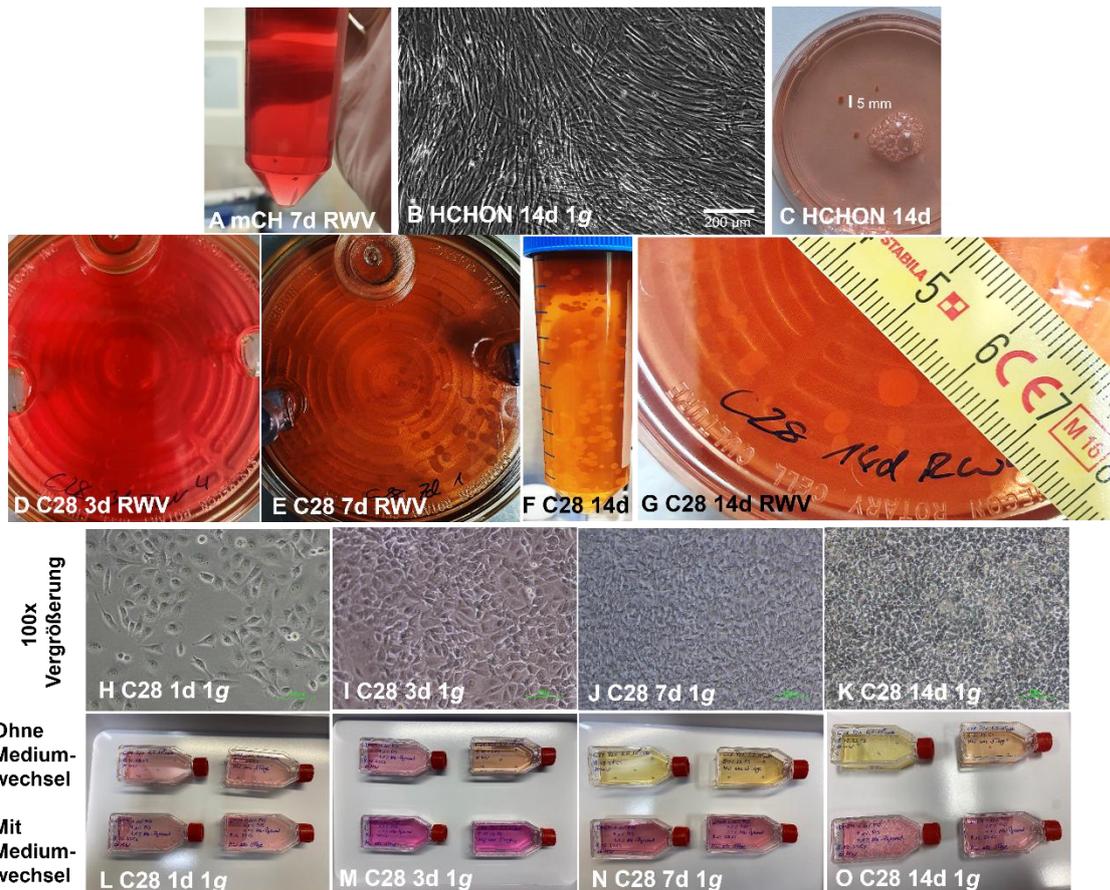


Abbildung 4 – Ergebnisse der Chondrozytenkultivierung unter $s\text{-}\mu\text{g}$ in der RWV.: (A): makroskopische Sphäroide der murinen Chondrozyten nach 7 Tagen RWV-Exposition. (B): primäre humane Chondrozyten (hCHON) nach statischer 1 g Kultivierung. (C): Sphäroidbildung der hCHON nach 14 Tagen RWV-Exposition. (D-F): Darstellung der C28-Sphäroidbildung über die Zeiträume 3, 7 und 14 Tage unter $s\text{-}\mu\text{g}$ Konditionen. (H-K): mikroskopische Abbildungen der statischen 1 g C28 Kontrollen über die Zeiträume 1, 3, 7, 14 Tage. (L-O): Kulturflaschen der statischen 1 g C28/I2 Zellkultur (oben: ohne Mediumwechsel, unten: mit Mediumwechsel).

3.2. Histologische und immunhistochemische Analysen der humanen und murinen Sphäroide

3.2.1. Betrachtung der histologischen Präparate

Die als Übersichtsfärbung dienende HE-Färbung lieferte einen ersten Eindruck hinsichtlich der Organisation der Sphäroide. So zeigten sich nach 7 und 14 Tagen in der C28 Kulturreihe Aggregate mit hoher Zelldichte, dichterem Randbereich und teils aufgelockertem Zentrum. Auch konnte eine Zusammenlagerung einzelner Sphäroide beobachtet werden (vgl. Abbildung 5A, B).

Die Safranin-O/FastGreen Färbung (Abbildung 5C, D) brachte die Matrixproduzierenden Zellen deutlicher zum Vorschein, wobei die rötlich-orange bis lila Färbung die genannten Bereiche anzeigt.

Eine gesteigerte Kollagenproduktion konnte mittels Sirius-Rot-Färbung dargestellt werden. Hier heben sich in der Abbildung 5 E und F erneut die Randbereiche der Sphäroide hervor.

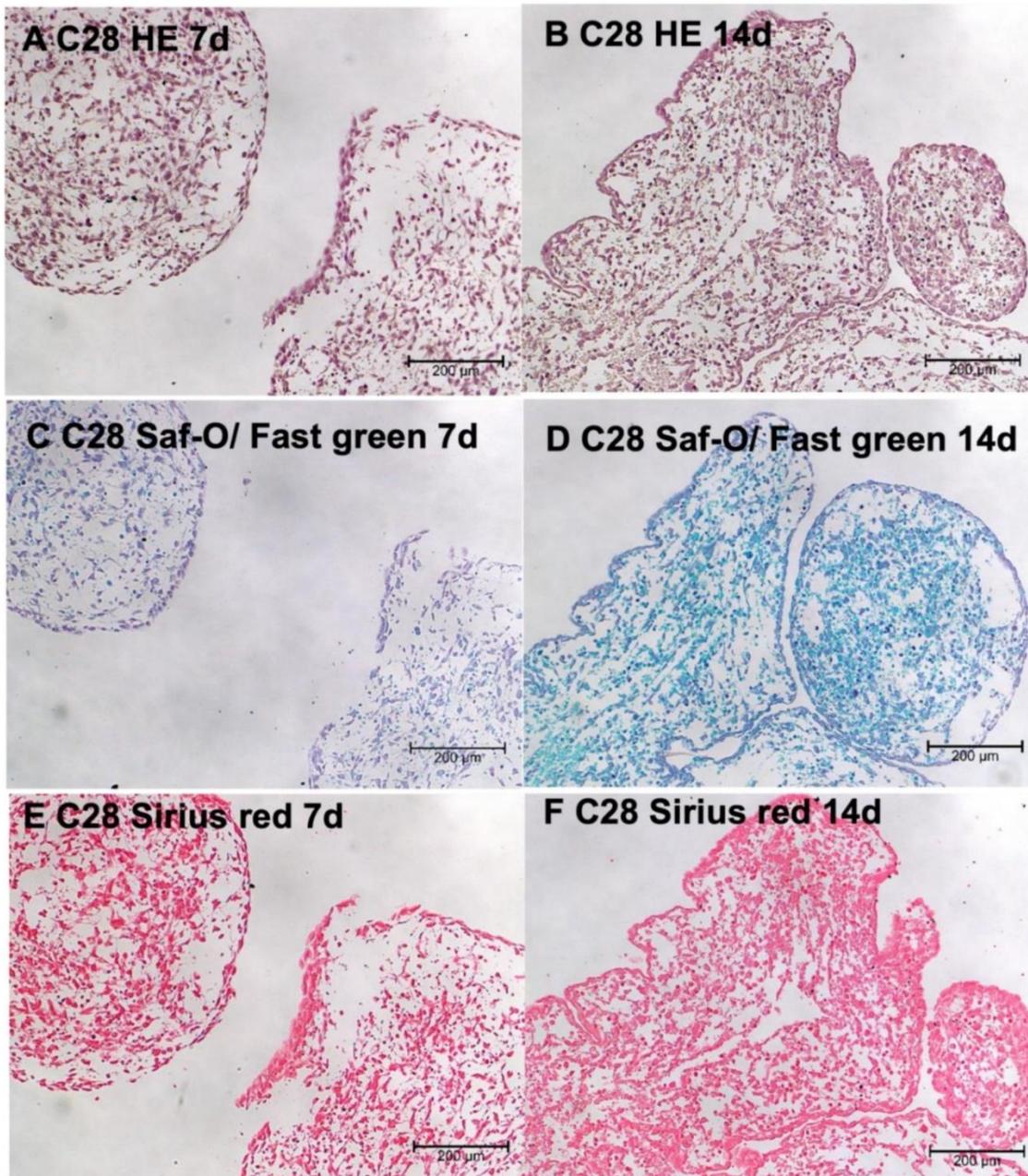


Abbildung 5 - Repräsentative Aufnahmen der mit HE (A, B) Safranin-O/FastGreen (C, D) und Sirius Rot (E, F) gefärbten Sphäroide der C28/12 Chondrozyten unter 7- bzw. 14-tägiger RWV-Exposition. Die Ergebnisse wurden in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

3.2.2. Untersuchung der immunhistochemischen Präparate

Immunhistochemisch wurden die Proben der humanen C28 und murinen Chondrozyten bezüglich der Expression von Kollagen-Typ I, Kollagen-Typ II und Kollagen-Typ X untersucht.

3.2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der humanen Proben

Die humanen Chondrozyten exprimierten Kollagen-Typ I zu allen drei untersuchten Zeitpunkten, wobei der Gehalt des Proteins zunahm. Ebenso verhielt sich das Kollagen-Typ II, welches nach 3 und 7 Tagen Exposition nachweisbar, jedoch in dem Proben nach 14 Expositionstagen am deutlichsten exprimiert war (Abbildung 6A – F).

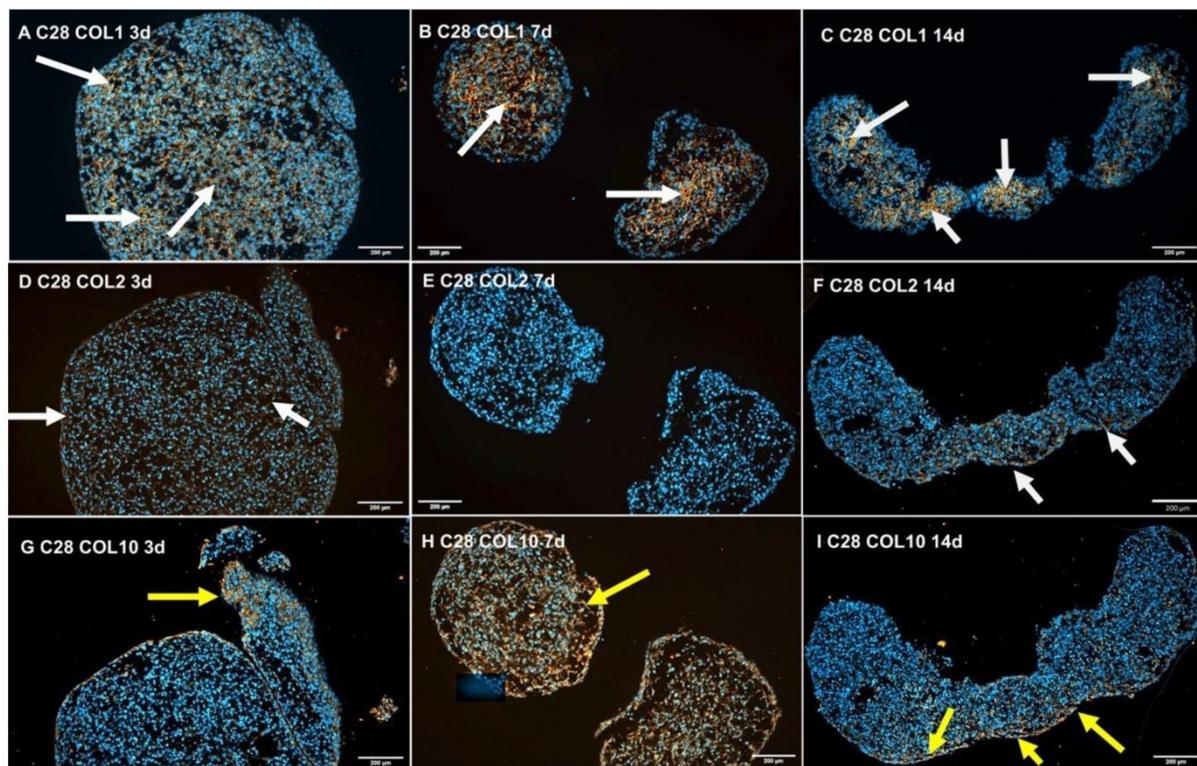


Abbildung 6 - Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen der Kollagentypen I (A – C), II (D – F) und X (G – I) der C28/12 Chondrozyten nach 3-, 7- bzw. 14-tägiger RWV-Exposition. Blaue Signale zeigen die Nuclei der Chondrozyten, die orangefarbene Fluoreszenz entspricht dem jeweiligen Kollagentyp. Die Pfeile weisen Kollagenexpressionsgebiete aus. Die Ergebnisse wurden in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

Auch die Färbungen gegen Kollagen Typ X zeigten positive Signale, vor allem in den Randbereichen der Sphäroide. Dies war zu allen Zeitpunkten der Exposition sichtbar mit einer Tendenz zur Verteilung vergleichbar zur Kollagen-Typ I Verteilung (Abbildung 6G – I). Durch die TUNEL-Färbungen der Gewebeproben, wie in Abbildung 7 zu sehen, konnte eine über den untersuchten Zeitraum zunehmende Apoptose-Rate visuell, als auch nach elektronischer Bildanalyse statistisch nachgewiesen werden.

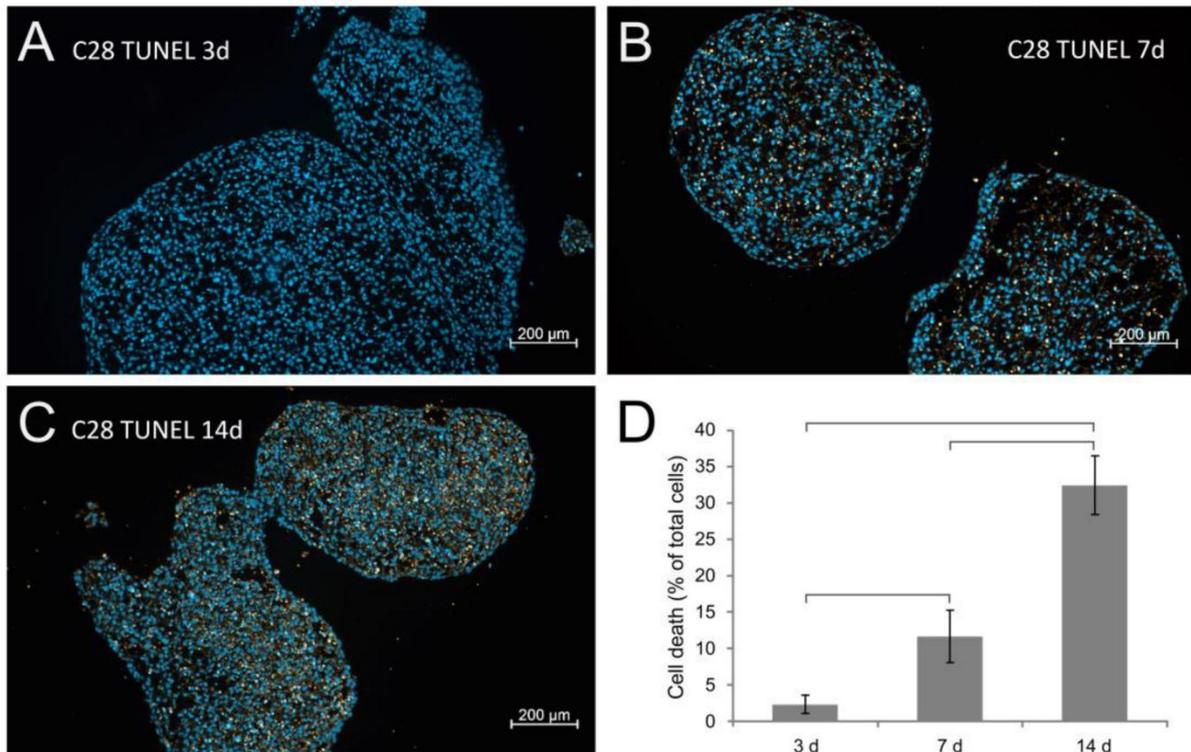


Abbildung 7 – Nachweis von Zelltod über den 14-tägigen Betrachtungszeitraum. Der Gehalt der orangenen Fluoreszenz (TUNEL-positiv) wurde quantifiziert und in Relation dargestellt. Die Gesamtzahl der Zellen durch Zählung der blauen, durch DAPI bedingten Kernärbung ermittelt. Repräsentative Bilder der 3- (A), 7- (B) oder 14- (C) tägigen Exposition sind dargestellt, ebenso die Ergebnisse der Quantifizierung (D). Die Klammern zeigen das Signifikanzniveau $p < 0,05$. Die Ergebnisse wurden bereits in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

3.2.2.2. Ergebnisse der murinen Proben

Die gebildeten Knorpel-Konstrukten der murinen Chondrozyten zeigen eine geringe Kollagen-Typ I Expression (Abbildung 8A). Diese findet sich im gesamten Gewebe mit leicht stärker Tendenz in weniger zellreichen Abschnitten. Das Kollagen-Typ II ist visuell stärker exprimiert, wobei sich insbesondere im Randbereich der Gewebeprobe Signalansammlungen bemerken lassen (Abbildung 8B). Die Kollagen-X-Expression scheint sich visuell auf abgegrenzte, teils zirkuläre Bereiche im Gewebe zu begrenzen (Abbildung 8C). Der Anteil im Zelltod befindlicher Zellen ist visuell in der TUNEL-Färbung gering, quantitativ ließ sich im Mittel eine Apoptose-Rate von 3,38 % ermitteln (Abbildung 8D).

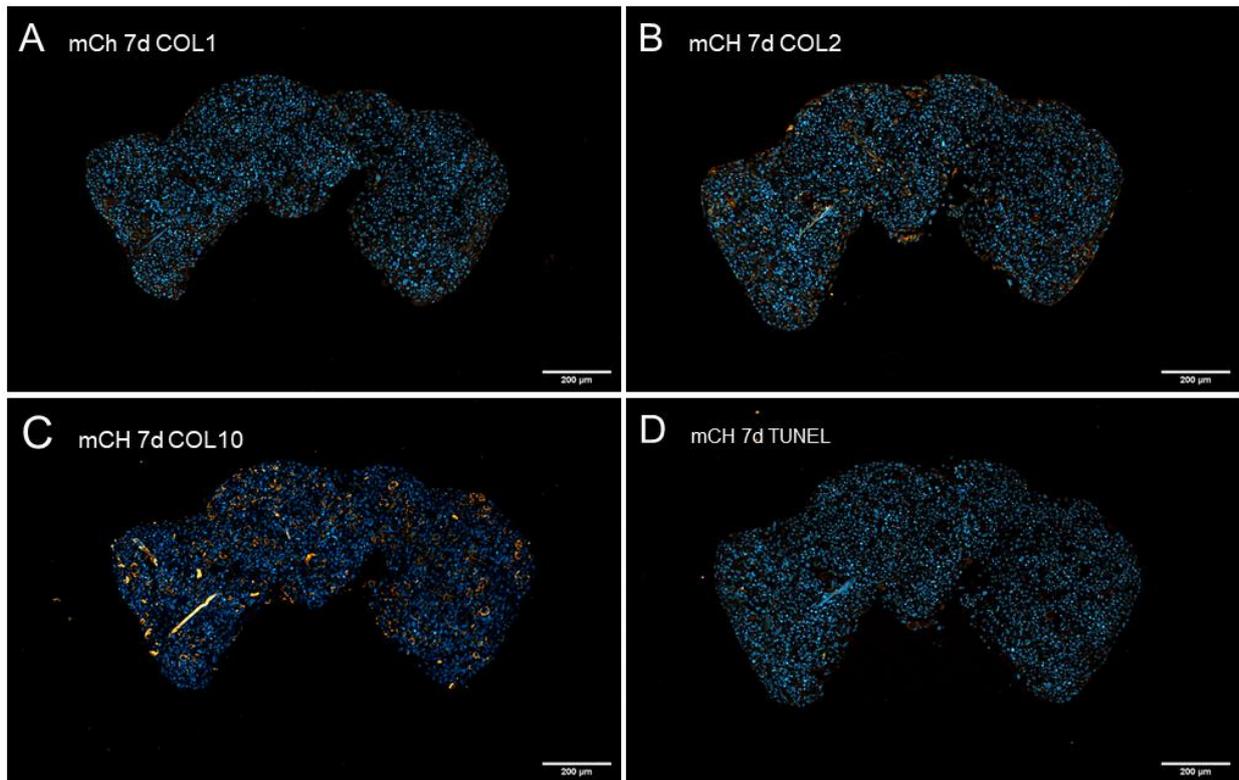


Abbildung 8 – Immunfluoreszenzfärbungen von murinen Chondrozyten über einen 7-tägigen Beobachtungszeitraum. (A – C) stellen die immunhistochemische Färbung der Kollagene I, II und X dar. (D) ist ein repräsentatives Bild der TUNEL-Färbung. Der Maßstab ist jeweils in der rechten unteren Ecke ausgewiesen.

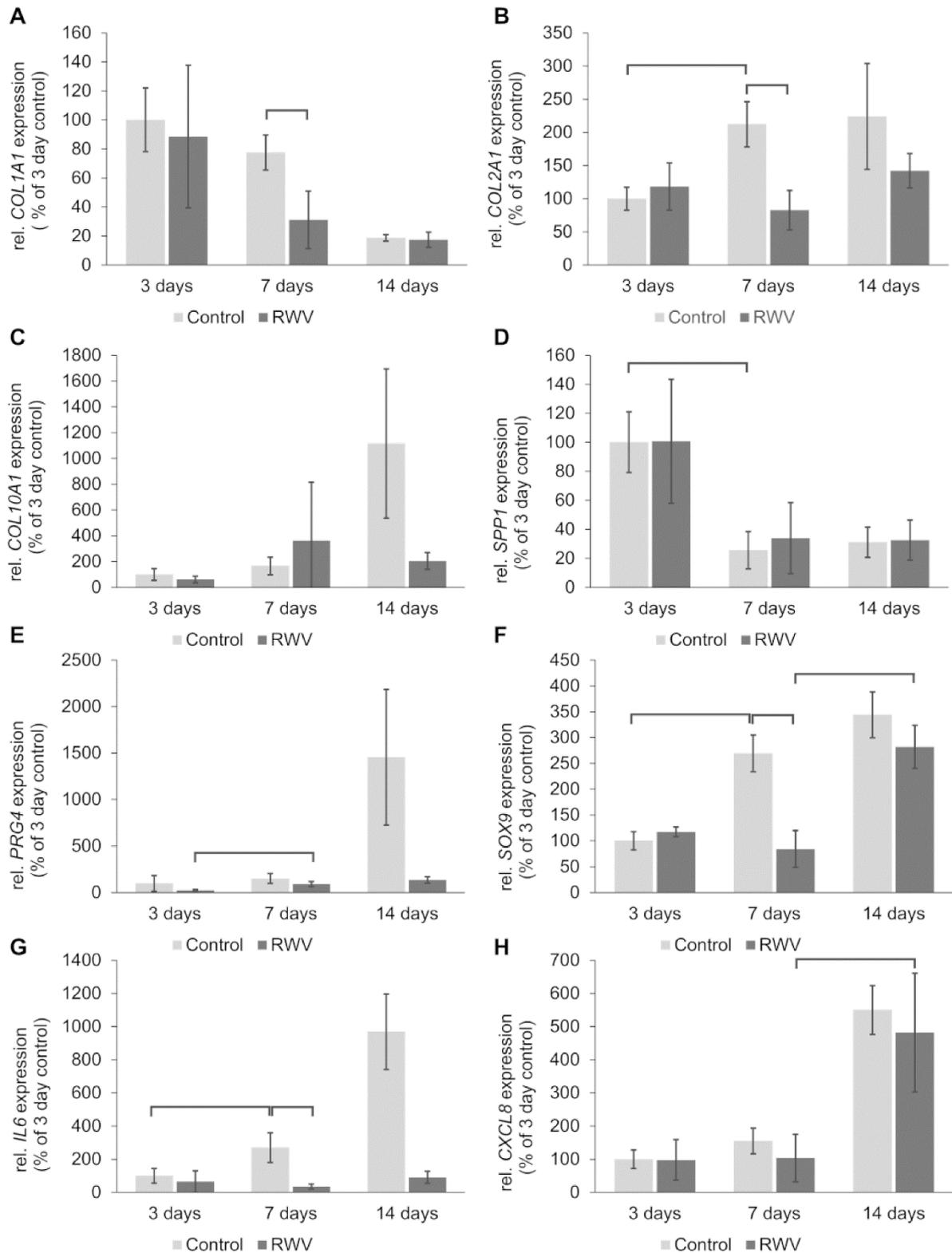
3.3. Genexpression von chondrozytären Signalfaktoren in 3D-Sphäroiden

3.3.1. Genexpression der C28/I2 Sphäroide

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) der C28 Zellen. Zwischen den Proben aus der RWV und den statischen 1 g Kontrollen gab es nach drei Tagen keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Genexpression von *COL1A1*, *COL2A1*, *COL10A1*, *SPP1*, *PRG4*, *SOX9*, *IL6*, *CXCL8*, *TGF β 1*, *RUNX2*, *CASP3*, *CASP8*, und *MMP13*.

Dagegen war nach 7-tägiger s- μ g Exposition gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Expression der Gene *COL1A1*, *COL1A2*, *SOX9*, *IL6*, *TGF β 1*, *RUNX2* und *CASP3* zu beobachten (Abbildung 9A, B, F, G, I – K). Zudem zeigte sich im Vergleich mit den Chondrozyten nach dreitägiger μ g-Einwirkung eine Reduktion der *CASP3*-mRNA Expression. (Abbildung 9K)

In den nach 14 Tagen gebildeten Sphäroiden zeigte sich in der Gegenüberstellung mit den 7 Tage alten Sphäroiden eine signifikante Steigerung der *SOX9*-, *CXCL8*-, und *TGFβ1*-Genexpression (Abbildung 9F, H, I)



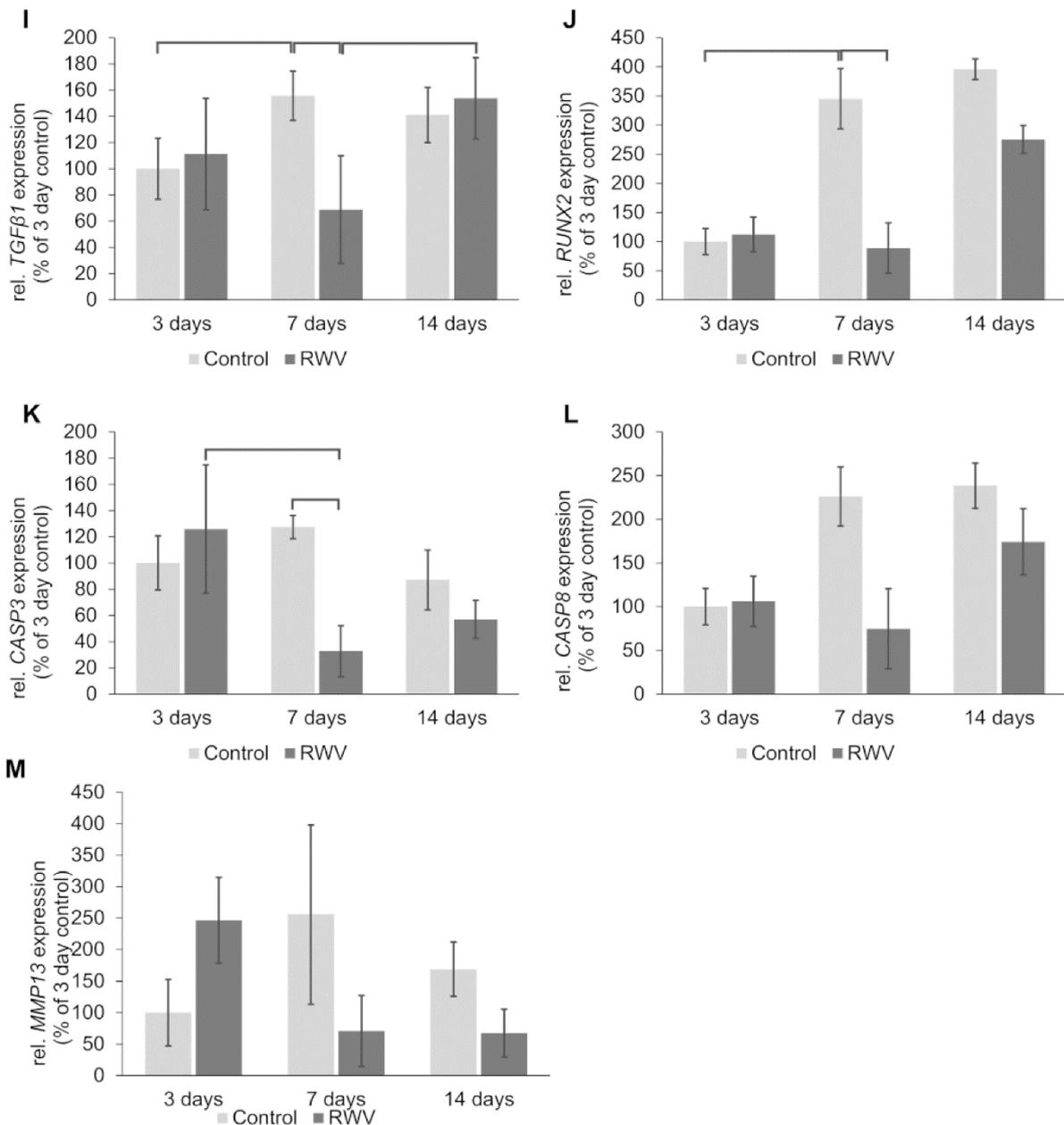
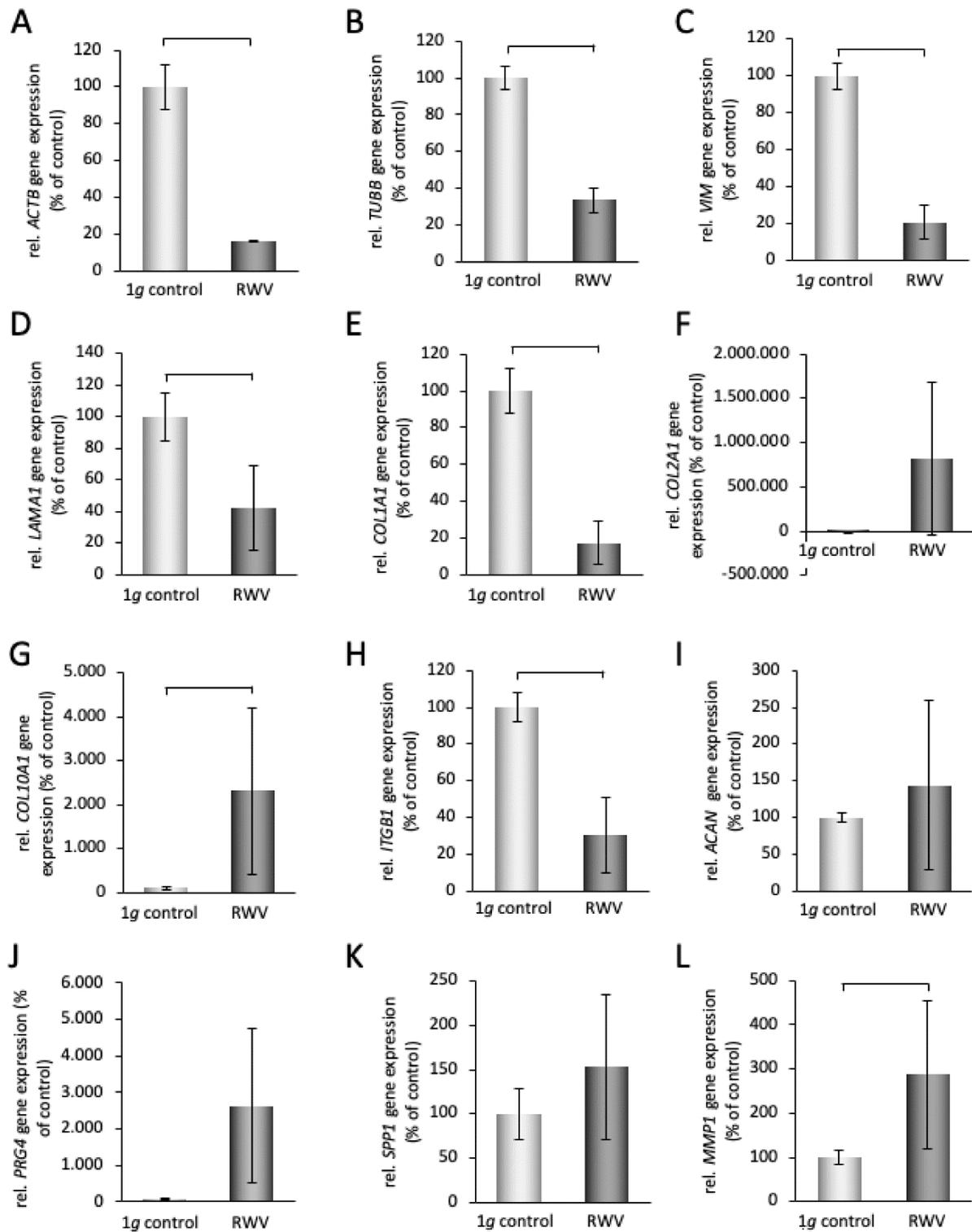


Abbildung 9 – Normierte mRNA-Expression von spezifischen Chondrozytenmarkern und anderen potenziellen Target-Genen der C28/12 Zelllinie nach 3-, 7-, und 14-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR. Hierbei stellen hellgraue Balken die statische 1g Kontrolle, und dunkelgraue Balken die RWV-exponierten Zellen dar. Die Klammern über den Balken weisen Signifikanzen mit einem Niveau von $p < 0,05$ aus. $n = 4$. Die Ergebnisse wurden zuvor in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

3.3.2. Genexpression der Sphäroide der primären humanen Chondrozyten

Es konnten in den 14-Tage-Sphäroiden gegenüber den statistischen Kontrollen signifikant gesteigerte Expressionen für die Gene *COL2A1*, *COL10A1*, *MMP1*, *MMP3*, *RUNX3*, *IL6*, *SOX9* und *CASP3* nachgewiesen werden (Abbildung 10F, G, K, L, N, R, T, U). Dagegen zeigten sich die Gene *ACTB*, *TUBB*, *VIM*, *LAMA1*, *ITGβ1*, und

COL1A1 herabreguliert (Abbildung 10A – E, H). Ohne statistisch signifikante Expressionsveränderungen wurden die Gene *ACAN*, *SPP1*, *RUNX2*, *TGFβ1*, *SOX6*, *SOD3*, *CXCL8* und *CASP8* nachgewiesen (Abbildung 10I, J, M, O – Q, S, V).



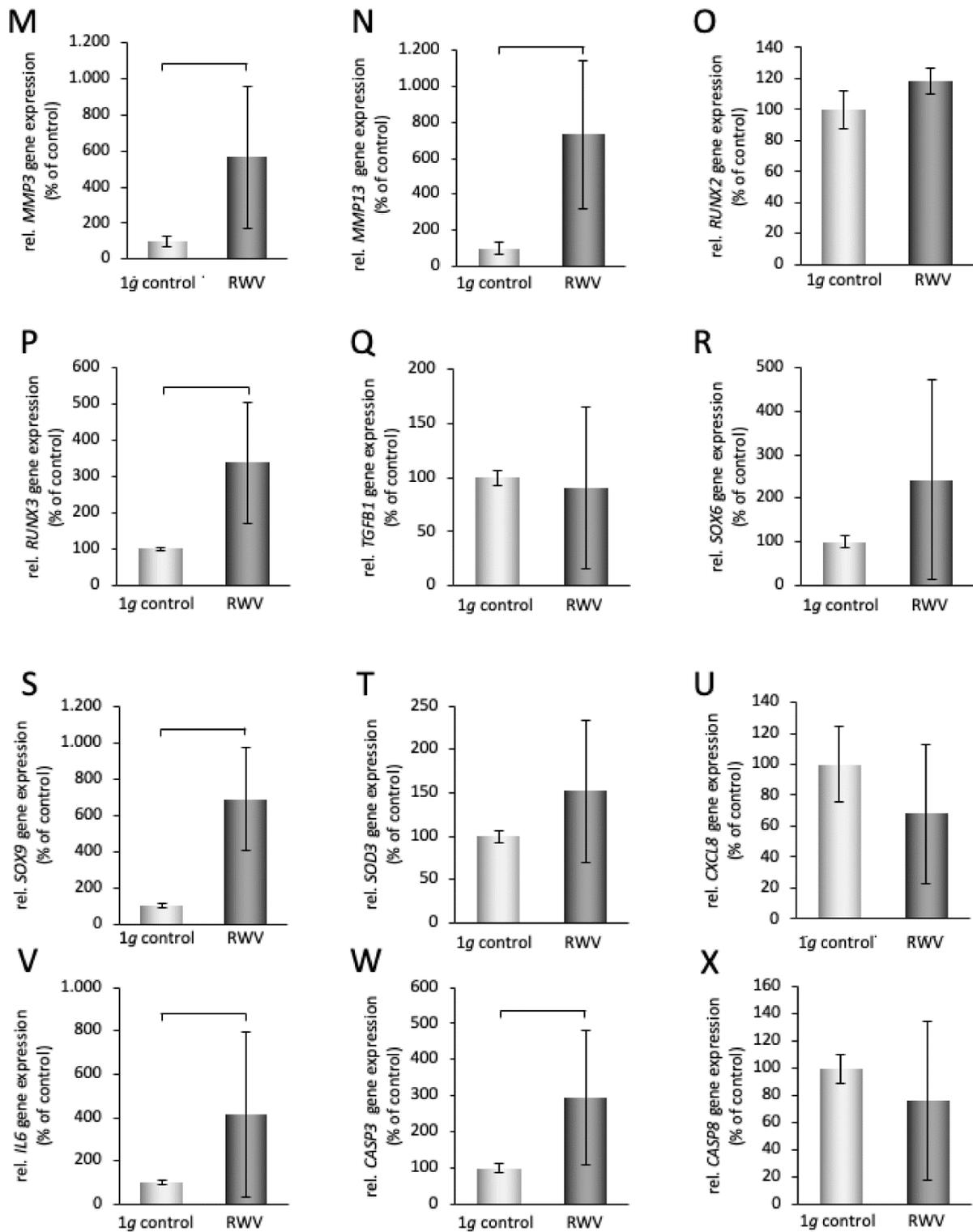


Abbildung 10 – relativierte mRNA-Expression von spezifischen Chondrozytenmarkern und anderen potenziellen Target-Genen der primären humanen Chondrozyten nach 14-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR. Hierbei stellen hellgraue Balken die statische 1 g Kontrolle, und dunkelgraue Balken die RWV-exponierten Zellen dar. Die Klammern über den Balken weisen Signifikanten mit einem Niveau von $p < 0,05$ aus. $n = 5$ für RWV, $n = 10$ für Kontrollen. Die Ergebnisse wurden zuvor in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

3.3.3. Genexpression der murinen Sphäroide

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse der murinen Knorpelgewebe zeigte sich lediglich die *MMP13*-Expression als statistisch signifikant gesteigert (Abbildung 11H).

Wenn auch nicht statistisch signifikant sind die Gene *ACAN*, *COL2A1*, *PRG4* und *SPP1* (Abbildung 11B, D, E, F) in der Tendenz gesteigert. Die Expression der Gene *COL1A1*, *COL10A1* und *RUNX2* (Abbildung 11A, C, G) ist tendenziell reduziert.

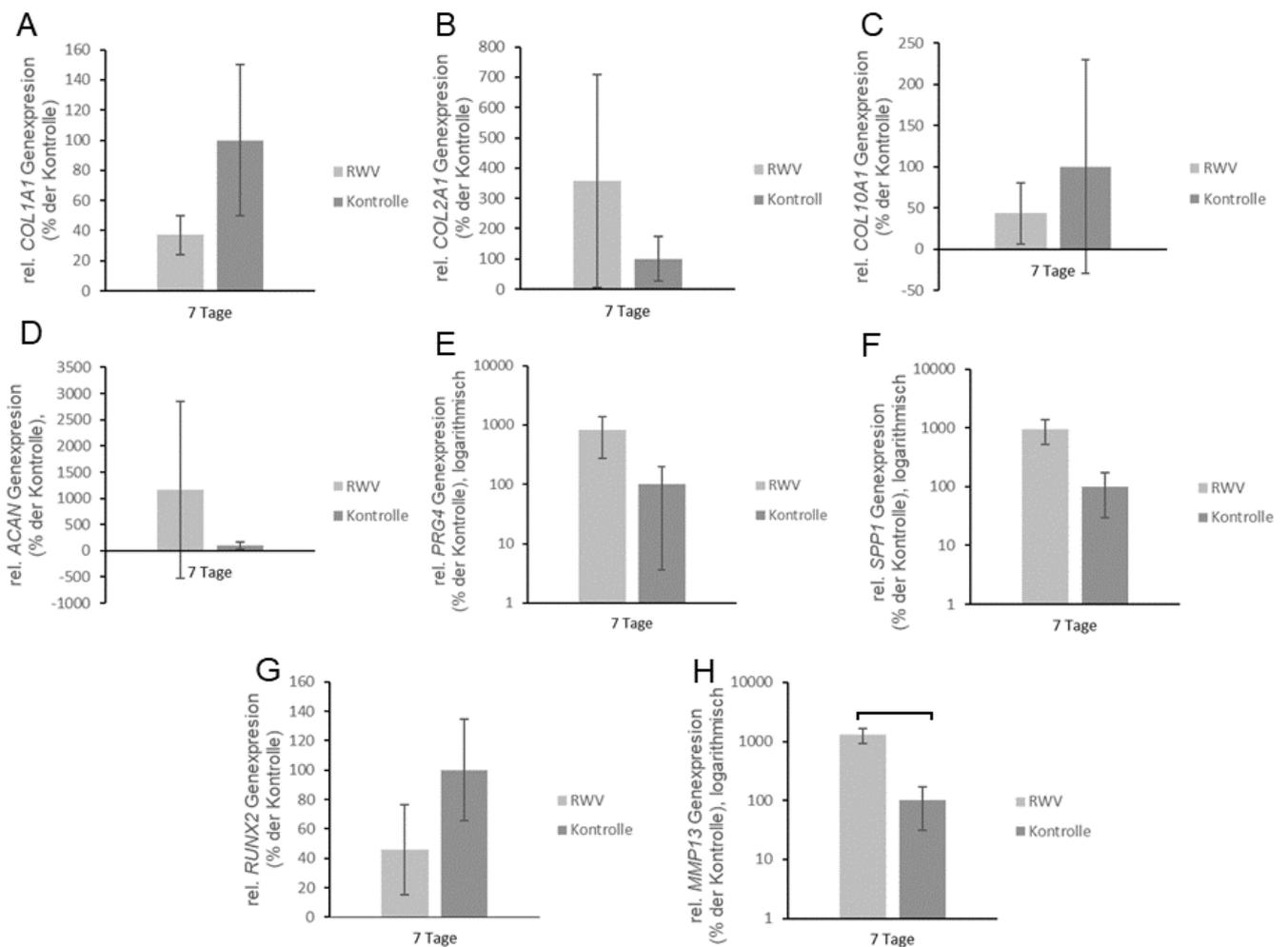


Abbildung 11 - relativierte mRNA-Expression von spezifischen Chondrozytenmarkern und anderen potenziellen Target-Genen der murinen Chondrozyten nach 7-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR. Hierbei stellen dunkelgraue Balken die statische 1 g Kontrolle, und hellgraue Balken die RWV-exponierten Zellen dar. Die Klammern über den Balken weisen Signifikanten mit einem Niveau von $p < 0,05$ aus. $n = 3$ für RWV und Kontrollen.

3.4. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)

Analyse

Eine Übersicht der qPCR-Daten, welche aus den C28 Experimenten resultierten, bietet Abbildung 12A und erleichtert die Interpretation der Ergebnisse. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Vergleich zu den statischen 1 g Kontrollen keine signifikanten Unterschiede bei drei- oder 14-tägiger Exposition bestehen. Dagegen ist die Herabregulation der Gene *IL6*, *COL1A1*, *COL2A1*, *TGFβ1*, *SOX9*, *RUNX2*, *CASP3* und *CASP8* in der 7-tägigen RVW-Kultur deutlich zu erkennen. In der gegenüberliegenden Abbildung 12B wird ein Interaktionsnetzwerk der untersuchten Gene und Proteine gezeigt und Signifikanzen ausgewiesen.

Die gesamten qPCR-Daten der hCHON Versuchsreihe sind der Abbildung 12C zu entnehmen. Diverse differenzielle Expressionen sind erkennbar. Signifikant waren diese bei *IL6*, *CXCL8*, *ACTB*, *TUBB*, *VIM*, *ACAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *COL10A1*, *ITGβ1*, *LAMA1*, *MMP1*, *MMP13*, *SPP1*, *RG4*, *RUNX2*, *RUNX3*, *TGFβ1*, *SOX6*, *SOX9*, *SOD3*, *CASP3* und *CASP8*. Die Zusammenhänge der untersuchten Gene wurden in der nebenstehenden Abbildung 12D veranschaulicht. Hierbei werden Mehrfachinteraktionen im Besonderen für die Zielgene *MMP1*, *MMP13*, *SPP1*, *ITGβ1*, *ACAN*, *IL6*, *RUNX3*, und *SOX9* deutlich.

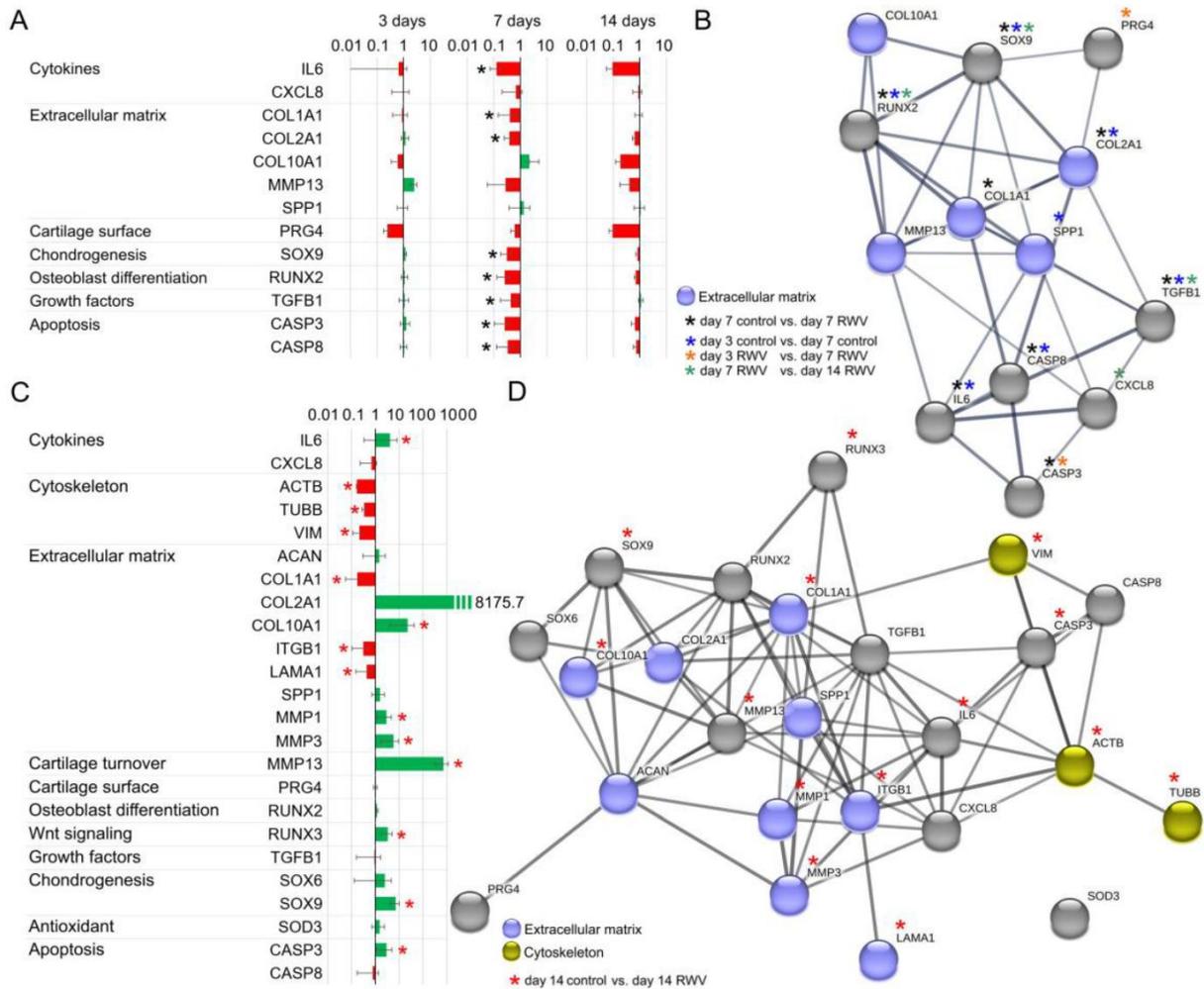


Abbildung 12 – Ein Überblick über die Genexpression (A, C) und EMBL STRING Proteininteraktionen (B, D) der qPCR-Analysedaten der Sphäroide der C28/12 Zelllinie (A, B) bzw. der primären humanen Chondrozyten (C, D). Hierbei werden nominal signifikante Expressionsunterschiede mit einem p -Wert $< 0,05$ mit Sternen markiert. Farbliche Kennzeichnung weist funktionelle Zusammenhänge aus. Die Ergebnisse wurden zuvor in Steinwerth et al. (2023) (73) veröffentlicht.

4. Diskussion

Die Weltraumforschung beschäftigt sich derzeit immer mehr mit den Themen Tissue Engineering, sowie Gravitationsbiologie und Weltraummedizin. Auch die Krebsforschung ist näher in den Fokus gerückt (57; 58; 87).

Nicht zuletzt im Kontext der weiteren Exploration des Weltalls spielt das Wissen um die Auswirkungen der Mikrogravitation auf den menschlichen Organismus und die dabei involvierten Stressoren eine große Rolle. Die Anwendung fortschrittlicher Technologien, wie beispielsweise 3D-Druck oder Tissue Engineering, spielen eine Schlüsselrolle bei der Umsetzung zukünftiger Forschungsprojekte der NASA, der europäischen Weltraumbehörde (ESA) oder anderer Raumfahrtbehörden (88).

Vorangegangene Studien konnten Faktoren der Knorpelbiosynthese identifizieren und beschreiben (89). Auch der Einfluss von μg auf humane Zellen wurde vielfach dargestellt (90). Zur weiteren Entwicklung komplexer dreidimensionaler *in-vitro* generierter Knorpelsphäroide scheint die Verbindung der Forschungen zu Knorpelsynthese und Mikrogravitation jedoch vielversprechend und die Anwendungen, wie etwa die personalisierte Behandlung von Arthrose oder Knorpelschäden, zahlreich. Daher sollte ein vorrangiges Ziel sein, die bisher gewonnenen Erkenntnisse aus der μg -Forschung und der Knorpelgenese zu kombinieren. Die Identifikation wichtiger Geninteraktionen diverser solcher Markergene konnte sowohl bei C28/I2 als auch bei den primären humanen Chondrozyten durch die *in-silico* Analyse (Abbildung 12) erfolgen.

Seit langem stehen die vielfältigen strukturellen Veränderungen von Zellen, die realer oder simulierter Schwerelosigkeit ausgesetzt sind, im Fokus der Forschung. So zeigen exemplarisch sowohl maligne, als auch benigne Zellen unter Mikrogravitation Modifikationen in Bezug auf Proliferation, Wachstumsverhalten, Apoptose, Zelladhäsion und Migration (91; 92). Dass unterschiedliche Arten von Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen aufgrund nahezu schwereloser Zellkulturbedingungen ein dreidimensionales Wachstum aufweisen, wurde schon in den frühen 1990- und 2000er Jahren nachgewiesen (93; 50; 94–97).

4.1. Tissue Engineering unter Mikrogravitationsbedingungen

Einen Überblick über die bisherigen wissenschaftlichen Errungenschaften bezüglich des Züchtens von Gewebe mithilfe von Mikrogravitation veröffentlichten 2023 Cui et al. (98). Nicht zuletzt in Hinblick auf eine mögliche menschliche Besiedlung von Mond und Mars liefert die aktuelle Forschung im Bereich des Tissue Engineerings und der Biofabrikation unter Mikrogravitation nützliche Informationen und Techniken. Mit dem übergeordneten Ziel, ganze Organe oder zumindest Organoide zu züchten, können für den Bereich der translationalen regenerativen Medizin praktische neue Informationen und Techniken gewonnen werden. Auch die Tumorforschung kann von solchen Modellen, die der *in-vivo* Situation stärker ähneln, profitieren (57; 58).

Die von der NASA entwickelte ‚*Rotating Wall Vessel*‘ wird als Bioreaktor nach wie vor für Studien, welche den Mikrogravitationseinfluss auf entartete Zellen untersuchen, genutzt (99; 100). Das dreidimensionale Wachstum, welches unter diesen Bedingungen beobachtet wird, ist auf die ausbleibende Zellsedimentation bei zugleich geringen Scherkräften zurückzuführen. Daher hat die RWV ein breites Anwendungsspektrum im Bereich des Tissue Engineerings. Die Nutzung der RWV zur Forschung an Chondrozyten und die Knorpelgewinnung mit und ohne Trägermaterial wurde zunächst 1993 von Freed et al. und zehn Jahre später von Marlovits et al. beschrieben (69; 70; 96).

Auch diese Arbeit knüpft an die genannte Methode an. Sowohl die untersuchten primären humanen und murinen Chondrozyten als auch die verwendete Zelllinie zeigten bereits nach drei Tagen Aggregationstendenzen und erreichten am Ende des 14-tägigen Experiments Knorpelgewebekonstrukte mit einem Durchmesser von bis zu 3 mm (primäre Zellen) bzw. 5 mm (C28/I2) (vgl. Abbildung 4).

Dennoch ist die RWV nicht die einzige vielversprechende Methode. Eine weitere Methode zur Mikrogravitationssimulation ist die ‚*Random Positioning Machine*‘, die vergleichbare Tissue Engineering-Kapazitäten aufweist (65). So konnte gezeigt werden, dass humane Chondrozyten, die ebenso bis zu zwei Wochen der RPM-Stimulation ausgesetzt waren, sich ohne Trägermaterial zu bis zu 2 mm großen Knorpelgewebestücken zusammenlagern und eine charakteristische extrazelluläre Matrix bilden. Dieser Prozess begann bereits nach 5 Tagen (65). Die RPM wurde genutzt, um frühe Effekte ab bereits 30 Minuten bis zu 24 Stunden zu analysieren (66).

Zusammen mit Ergebnissen aus Parabelflugmanövern, welche über wiederholte kurzzeitige Episoden Mikrogravitationsbedingungen von etwa $10^{-2} g$ bieten, konnten Veränderungen der Struktur des Zytoskeletts vor der Aggregation der Zellen und bezüglich der extrazellulären Matrix-Produktion nachgewiesen werden. Ein Anstieg von *BMP-2*, *TGF- β 1* und *SOX9* vermittelt diese Veränderungen (66; 101). Demgegenüber erweist sich das *TGF- β 1* nach der Langzeit-Exposition während dieser Arbeit nahezu unverändert und lediglich die *SOX9*-Gen-Transkription zeigte eine Steigerung. Auch hinsichtlich der Lebensfähigkeit der Zellen scheinen Parabelflugmanöver keinen Einfluss auszuüben, vielmehr ließ sich eine Steigerung der anti-apoptischen Genexpression nach 31 Parabeln nachweisen (102).

Insgesamt scheint die effektive Knorpelgewebeerstellung mit den Geräten zur Simulation von Mikrogravitation evident, doch stellt sich die Frage der Übertragbarkeit auf reale Bedingungen. Experimente, welche Freed et al. durchführten, verglichen die Beschaffenheit und Eigenschaften von 3D-Knorpelkonstrukten unter realen μg -Bedingungen auf der russischen MIR-Raumstation und in einem terrestrischen Bioreaktor über drei Monate. Beide Methoden produzierten Knorpel, welcher typische Proteoglykane und Kollagen-Typ II aufwies, jedoch unter Nutzung von Polyglykolsäure-Trägermaterial (96). Ein weiterer Methodenvergleich erfolgte mit Knorpelzellen vom Schwein. Ein Schweizer Forschungsteam verglich die Daten einer 16-tägigen RPM-Exposition mit statischen Kontrollen und Zellen, welche im Zuge der Cervantes Mission auf der Internationalen Raumstation (ISS) realer Schwerelosigkeit ausgesetzt waren (61; 97). Das Knorpelgewebe, das in der RPM entstand, ordnete sich in seinen Eigenschaften zwischen den ISS-Konstrukten und der 1g-Kontrolle ein, da es trotz dichter Matrix ein geringeres Kollagen-II/Kollagen-I-Verhältnis aufwies. Dennoch kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die RPM ein „nützliches Tool zur Produktion von Knorpelgewebe“ sei (61).

4.2. Proteine der extrazellulären Matrix und regulatorische Signalfaktoren im Neoknorpel aus Chondrozyten der C28/12 Zelllinie

Die dreidimensional gewachsenen Gewebe der RWV-Experimente lassen sich klar als Knorpel erkennen. Dies ist sowohl durch die immunhistochemischen Nachweise der Kollagen-Typen I, II und X zu erkennen, als auch durch die histologischen

Färbungen, insbesondere Safranin-O und Sirius Rot (Abbildung 5). Daraus ergeben sich eine Vielzahl möglicher Anwendungsmöglichkeiten für die Gewebe. Diese reichen von der Knorpelersatztherapie für Patienten mit Arthrose, bis zur Versorgung von Traumafolgen, bei denen je nach Altersgruppe 5 – 20 % Knorpeldefekte auftreten (11; 103).

Bemerkenswert ist die Apoptoserate der C28/I2-Zellen in der TUNEL-Färbung. Während nach drei Tagen lediglich 4,6 % TUNEL-positive Zellen in den Sphäroiden darstellbar waren, stieg die Zahl über 18,4 % nach sieben Tagen auf 31,3 % nach 14 Tagen an. In der Literatur werden Werte zwischen <1 – 5 % für gesunden Knorpel angegeben (104; 105). Eine naheliegende Erklärung hierfür wäre die simulierte Mikrogravitation selbst. In Vorarbeiten konnten jedoch reduzierte oder unveränderte Apoptoseraten nach kurz- und langfristiger μg Exposition nachgewiesen werden (106; 107). Eine mögliche Erklärung ist der Einfluss von Sauerstoff- und Nährstoffmangel in der stark proliferativen C28/I2 Zellkultur. Über die Expression „*Hypoxia-induced factors*“ (HIFs) wird die Apoptose angeregt (108). Gleichzeitig müssen auch Limitationen der TUNEL-Methode bedacht werden und in zukünftigen Studien morphologische Apoptoseindikatoren einbezogen werden.

Durch die Betrachtung der Genexpressionsmuster der Kollagene können Rückschlüsse auf die Funktions- und Überlebensfähigkeit der produzierten Gewebe gezogen werden. Nach dem immunhistochemischen Nachweis der Kollagen Typen-I und -II vor allem in den 14 Tagen Geweben (Abbildung 6) ist interessanterweise die Genexpression von *COL1A1* im Vergleich zur statischen Kontrolle zu frühen Zeitpunkten verringert und auch nach 14 Tagen jedoch unverändert niedrig. Ein gleiches Muster ist bei der Expression von *COL2A1* zu beobachten, die ebenso im Vergleich zu den Kontrollen in den RWV-Geweben reduziert ist. Über die verschiedenen Untersuchungszeiträume zeigt sich bei den RWV-Proben keine Veränderung des Gehalts an *COL2A1*-mRNA. Eine Erklärung hierfür kann die gleichbleibende Transkription des Gens *MMP-13* (vgl. Abbildung 9M) geben. Als wesentliche Matrix-Metalloprotease für die Degradation von Knorpelgewebe spaltet diese unter anderem Kollagen-Typ II. Sie ist auch ein Ansatz zur Entwicklung neuer Arthrosetherapie Strategien (109).

Wie schon im Kurzzeitexperiment über 24h auf der RPM untersucht (65), zeigte sich *COL10A1* ebenso nicht signifikant verändert, auch wenn es zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Als einer der Marker für die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten ist *COL10A1* durch *RUNX2* reguliert (99; 100). Die *RUNX2* Expression war nach drei und 14 Tagen nicht signifikant verändert, war aber zur Vergleichsgruppe nach sieben Tagen signifikant vermindert nachweisbar (vgl. Abbildung 9J), was als Erklärung für die *COL10*-Expression dienen kann. Auch das Gen *SPP1*, welches durch *RUNX2* reguliert wird (100), ist in den RWV Proben unverändert nachweisbar.

Kritischer zu betrachten ist die nicht-geänderte mRNA-Menge des Proteoglykan-4-Gens. *PRG4* ist das Gen, welches das extrazelluläre Matrix Proteoglykan Lubricin codiert. Dieses wirkt in der Oberflächenzone von Knorpelgewebe als Widerstandsmechanismus gegen Kompressionskräfte und protektiv gegen die Entwicklung von Arthrose. Frühere Arbeiten zeigten bereits eine Gravisensitivität des Gens (110), welche aufgrund der Funktion auch nachvollzogen werden kann.

Auch die mRNA-Expression des *IL6*-Gens war zu sämtlichen Untersuchungszeitpunkten niedrig. Allerdings zeigte sich eine statistisch signifikante Herunterregulation des Gens sich nur nach 7 Tagen. Dieses Ergebnis ist interessant, da IL-6 als proinflammatorisches Zytokin sowohl Matrix-abbauende Enzyme induziert und somit den Arthroseverlauf beschleunigt, als auch anti-katabole Faktoren reguliert, welche wiederum protektiv auf das Knorpelgewebe wirken (111). Das Interleukin-8-Gen (*CXCL8*) war zu jedem Zeitpunkt nicht signifikant verändert, aber unterschiedlich zu den statischen Kontrollen exprimiert. Insgesamt zeigten die Proben des 14-tägigen Experiments einen höheren mRNA-Gehalt, was auf die spezifische Rolle des Chemokins bei der Entwicklung von Knorpel hinweist. IL-8 spielt unter anderem eine wichtige Rolle als Induktor der zellulären Seneszenz und damit einhergehender inflammatorischer Prozesse (112).

Als einer der Schlüsselfaktoren der Chondrogenese und der zugehörigen Differenzierung von Knorpelzellen wurde der SRY-box Transkriptionsfaktor 9 (*SOX9*) untersucht. Hierbei zeigte sich nach initial niedriger Expression eine signifikante Steigerung nach sieben Versuchstagen in der Kontrollgruppe, wobei die RWV-Proben im Vergleich zum Vorzeitraum eine niedrigere Expression aufwiesen. Nach weiteren

sieben Tagen konnte eine erneute Steigerung der Expression im Vergleich zum Vorzeitraum vermerkt werden (Abbildung 9F). Dies lässt auf eine Beeinflussung des Tissue Engineerings schließen. Es ist bekannt, dass SOX9, zusammen mit anderen Mitgliedern der SOXD-Familie, die Chondrogenese fördert (113). So ist die Genexpression in chondro- und osteogenen Tumoren erhöht und bei Arthrosepatienten verringert. Dabei hat SOX9 auf diverse Signalwege Einfluss, unter anderem TGF- β 1 (113). Dieser zeigte sich korrelierend nach 7 Tagen in den RWV-Proben reduziert und im Vergleich zwischen den 7 und 14 Tagen exprimierten Proben nach dem längeren Zeitraum signifikant gesteigert (Abbildung 9I). Somit unterstützen diese Ergebnisse die bereits früher beschriebenen protektiven Effekte von SOX9 und *TGFB1* auf Knorpelzellen. Beide Signalfaktoren scheinen an der Regulation des dreidimensionalen Gewebewachstums von Chondrozyten auf der RWV beteiligt zu sein.

4.3. Regulation unterschiedlicher Signalwege von biologischen Prozessen im Neo-Knorpel aus primären humanen Chondrozyten

Um Unterschiede im Wachstumsverhalten und der Gewebebeschaffenheit herauszuarbeiten, wurden neben den immortalisierten C28/I2 Chondrozyten auch kommerziell erworbene primäre humane Chondrozyten in niedrigen Passagen in Bezug auf die Möglichkeit des Tissue Engineerings unter simulierten Mikrogravitationsbedingungen untersucht.

Die Notwendigkeit, möglichst anatomischen Knorpel zu gewinnen, kann aus einem der Experimente der BION-M1 Raummission abgeleitet werden. Das Team von Fitzgerald et al. konnte in Gelenkknorpelproben von Mäusen, welche sich im Rahmen der Mission 30 Tage lang in Schwerelosigkeit aufhielten, Knorpeldegenerationen im Vergleich zu den Bodenkontrollen nachweisen (114). Diese Degenerationen führten die Autoren auf Veränderungen der extrazellulären Matrix, dem Abbau von Proteoglykanen und Verminderungen der mRNA-Expression entsprechender Gene zurück, welche alle gravisensitiv und mechano-responsiv seien. Interessanterweise fanden sich diese degenerativen Veränderungen nur bei hyalinem Gelenkknorpel, welcher unter Normalgravitation der Körperlast ausgesetzt ist und nicht bei

fibrinöserem sternalem Knorpel, welcher auch bei 1 g Bedingungen kaum Last trägt (114).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten Veränderungen der extrazellulären Matrix und der Konstitution des Zytoskeletts nach Exposition in simulierter Mikrogravitation auf mRNA-Niveau nachgewiesen werden. Die Gene *ACTB*, *TUBB*, und *VIM* waren nach 14 Tagen signifikant reduziert (Abbildung 10A – C). Nach Parabelflügen als Modell der kurzzeitigen Simulation von Schwerelosigkeit konnte eine Steigerung von Zytoskelett-Komponenten in artikulären Chondrozyten gezeigt werden (101). Auch die Ergebnisse eines früheren 24-h-RPM-Experiments konnten die bedeutende Rolle des Zytoskeletts als Gravisensor belegen. Hierbei änderte sich die extrazelluläre Matrixregeneration und -organisation noch vor der Sphäroidbildung (66). Daher sind die Messungen dieser Arbeit zu diskutieren. Denkbar wäre eine zeitliche Komponente in der Relevanz der Zytoskelett-Komponenten. Die Beobachtung, dass Makrophagen nach elf Tagen Kultivierung unter Mikrogravitationsbedingungen keine signifikant veränderte Aktin- und Vimentinstruktur oder -menge hatten (115), stützt die These.

Während sich im Vergleich zu den statischen Kontrollen in dieser Versuchsreihe die mRNA-Expression für *COL2A1* und *COL10A1* steigerte, wurde für die mRNA von *LAMA1*, *COL1A1* und *ITGB1* eine Reduktion beobachtet. Über den 14-tägigen Zeitraum blieben *ACAN*, *SPP1* und *PRG4* unverändert. Daraus lässt sich ableiten, dass auch nach RWV-Exposition die primären Chondrozyten ihre spezifische Differenzierung beibehalten. Vor allem die Steigerung der *COL2A1*-Expression ist bei sinkendem *COL1A1*-Gehalt hervorzuheben. Des Weiteren spielt Aggrecan eine wichtige Rolle in der Knorpelfunktionalität. So konnte nachgewiesen werden, dass die Degeneration von Aggrecan-vermittelten Matrixaggregaten durch Spaltung der Verbindungen zu Hyaluron und anderen Bestandteilen, sowie eine verminderte Synthese von Chondroitinsulfat und Keratansulfat maßgeblich nachteilig auf die normale Knorpelfunktion auswirkt (116). Die beobachtete unveränderte *ACAN*-Expression ist daher vorteilhaft für die gewonnenen Gewebe. Selbiges gilt für *PRG4*, wobei die oben bereits beschriebene Funktionalität als Schutz vor externen Stressoren dient (117). Das Protein Osteopontin, welches durch das Gen *SPP1* (secreted phosphoprotein 1) codiert wird, dient als EZM-Protein der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und ist mitverantwortlich für die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten (118). Ein 24-stündiges RPM-Experiment lieferte Hinweise auf eine

zusätzliche Rolle bei der Aggregation der Chondrozyten zum frühen Zeitpunkt der Sphäroidbildung, da sich die *SPP1* Genexpression deutlich hochreguliert zeigte (65). Eine gleichbleibende Expression im Vergleich zu statischen Kontrollen nach 14 Tagen könnte auf die bereits deutlich frühere Zusammenlagerung der Chondrozyten hinweisen, welcher sich eine Normalisierung der Werte anschloss.

Ferner waren die Gene *MMP1*, *MMP3* und *MMP13* im Vergleich zu den statischen Kontrollen signifikant hochreguliert. Diese Gene kodieren verschiedene Metallo-Matrixproteinasen, die durch ein degeneratives Remodelling der extrazellulären Matrix zur Pathogenese der Arthrose beitragen (119). Dabei kodieren die Gene *MMP1* und *MMP13* Kollagenasen, welche vorrangig die Kollagen-Typen I, II, III, VIII und X, sowie Gelatine, Aggrecan und Entactin lysieren, und *MMP3* ein Stromelysin, welches die Kollagen-Typen III, IV, V, IX, X und XI, sowie Proteoglykane, Laminin und Fibronectin spaltet (119). Diese Steigerung könnte die Abnahme der *COL1A1*-Expression erklären.

Darüber hinaus kommt dem runt-related transcription factor (RUNX) eine Bedeutung bei der Knorpelhomöostase zu. Während RUNX3 über die gesteigerte Transkription von Lubricin und Aggrecan knorpelprotektive Eigenschaften aufweist, erhöht RUNX2 abhängig von inflammatorischen Co-Faktoren die Kollagen-Typ II Synthese oder die *MMP13*-Transkription (120). Es ist positiv zu bemerken, dass die Gewebeproben nach 14-tägiger RWV-Exposition signifikant gestiegene *RUNX3*-Level aufwiesen, wobei *RUNX2* unverändert blieb.

Die primären Chondrozyten zeigten Veränderungen der SOXD-Familie. Hierbei fanden sich signifikante Steigerungen der *SOX9*-Expression gegenüber den statischen Kontrollen, während *SOX6* keine Veränderung aufwies. Diese Daten bestätigen die oben ausgeführte positive Auswirkung von *SOX9* auf die Knorpelgenese in der simulierten Mikrogravitation (101; 113).

In den untersuchten RWV-Proben konnte darüber hinaus eine Steigerung der *IL6*- und *CASP3*-Expression nachgewiesen werden. Als inflammatorischer Marker ist IL-6 mit der gesteigerten Synthese von Metallo-Matrixproteasen vergesellschaftet, weshalb in gesundem Knorpelgewebe üblicherweise nur geringe Mengen nachgewiesen werden (121). Die erhöhte Produktion kann zu einer erhöhten Matrixdegeneration führen, die auch in Zusammenhang mit der beobachteten Apoptose stehen könnte.

4.4. STRING-Analyse-basierte Darstellung eines Interaktionsnetzwerkes der untersuchten Gene

4.4.1. Geninteraktionen von C28/I2 Chondrozyten unter Mikrogravitation

Das STRING Tool trifft, wie unter 2.2.6. beschrieben, unter Nutzung von Datenbanken Aussagen zu Interaktionen von Proteinen. Zur Generierung eines Interaktionsnetzwerkes wurden die korrespondierenden Proteine der in dieser Arbeit untersuchten Gene herangezogen. Hierbei sind eine hohe Anzahl an Verbindungen zu anderen Proteinen hinweisend auf ein dominierendes Zielgen. In der vorliegenden Analyse sind vielfältige Interaktionen zu erkennen, wobei im Besonderen die Proteine SOX9, COL1A1, IL6 und TGF β 1 hervortreten (vgl. Abbildung 12B) und Hinweis auf die Bedeutung der entsprechenden Gene auf die Knorpelbildung geben. SOX9 ist eines der Schlüsselgene für die Knorpelentwicklung und nach Expression als SRY-related Transkriptionsfaktor in Interaktion mit diversen Matrixbestandteilen und Chondrozytenmarkern. Durch *in-vitro* Gentransfer konnte gezeigt werden, dass SOX9 dosisabhängig die Expression der Gene *PRG4* und *COL2A1* steigern kann, unabhängig davon, ob bereits eine Arthrose vorliegt oder nicht (122). Weitere Interaktionen umfassen *COL1A1*, *COL10A1*, *SPP1*, *MMP13* und *RUNX2*. Das letzte Gen wirkt ebenso als Translationsregulator, wobei RUNX2 die *MMP13*-Expression unterstützt, jedoch unter inflammatorischen Bedingungen die *COL2A1*-Expression steigert (120). Knorpelprotektiv wirkt SOX9, indem es an das ossifizierend wirkende Glykoprotein Osteopontin bindet, es dadurch inaktiviert und die Matrixmineralisation hemmt (123).

Als Chondrozytenmarker ist auch *COL1A1* ein Gen, dessen Protein Verbindungen zu vielen untersuchten Signalfaktoren aufweist, unter anderem zu SOX9, MMP13, CASP8, COL2A1 und SPP1. Reguliert wird die *COL1A1*-Genexpression auch durch den Transkriptionsfaktor RUNX2. Diesem kommt in der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten im Zuge der enchondralen Ossifikation eine besondere Rolle zu, indem er die Transkription der Gene *COL10A1*, *SPP1* und *MMP13*, sowie von Knochenmatrixproteinen, wie COL1A1, SPP1 oder FN1 hochreguliert (100).

Der inflammatorische Marker IL6 zeigt in der Analyse Interaktionen mit CXCL8, MMP13, und den Caspasen 3 und 8. Auch TGF β 1 interagiert mit CASP8 und CXCL8, sowie zusätzlich mit SPP1 und COL2A1. Diese pro-inflammatorischen Zytokine sind

in destruierten Gelenken vermehrt exprimiert und können auf eine gesteigerte Apoptose hinweisen (124). Dabei bleibt unklar, inwiefern die chondrozytäre Apoptose zur Knorpeldegeneration beiträgt, oder ob sie lediglich Resultat der Destruktion ist. Unter anderem durch entzündliche Prozesse werden auch Caspase-3 und -8 gesteigert, was zur DNA-Fragmentierung und vermehrten Expression von Metallomatrixproteinen führt. Diese hat wiederum eine Abnahme von Typ II-Kollagen und Aggrecan zur Folge (18). SOX9 ist wiederum aufgrund seiner regulatorischen Funktion bei der Chondrogenese fähig, Apoptose zu unterbinden, was in der embryonalen Entwicklung an Extremitätenknospen gezeigt werden konnte (125).

4.4.2. Geninteraktionen von primären humanen Chondrozyten unter Mikrogravitationsbedingungen

Eine Vielzahl der untersuchten chondrozytären Marker und Signalfaktoren zeigte Korrelationen in der STRING Analyse und ließ daher Rückschlüsse auf die Rolle ihrer korrespondierenden Gene zu. Neben den Matrixbestandteilen Kollagen-Typ II und X, befanden sich auch prominente Proteine wie IL6, MMP3 und 13, RUNX3, SOX9 und CASP3 (vgl. Abbildung 12D). Den entsprechenden Genen konnte in früheren Arbeiten ihre Bedeutung für die Knorpelsynthese und ihre Gravisensitivität nachgewiesen werden (101; 102). Bereits im vorhergehenden Abschnitt wurden einige dieser Interaktionen beschrieben. Hierbei sind Aspekte wie das Verhalten der extrazellulären Matrix, die Chondrogenese und Differenzierung zu Osteoblasten, sowie Apoptose für das Tissue Engineering von funktionsfähigem Knorpelgewebe zu erwähnen.

Es ist zu bemerken, dass sich der Neoknorpel der C28/I2 Chondrozyten im Vergleich zur 14-tägigen Kontrollgruppe nicht signifikant bezüglich des Genexpressionsniveaus unterschied, wohingegen sich im Gewebe der 14 Tage RWV-exprimierten primären humanen Chondrozyten 14 der 24 untersuchten Gene (Abbildung 12C) signifikant verändert nachweisbar waren. Dies stellt die Vergleichbarkeit der beiden Chondrozytenmodelle auf den Prüfstand. Während die hCHON niedrig-passagierte aufgereinigte primäre Zellen aus artikulärem Hüftgelenksknorpel sind, stammt die C28/I2 Zelllinie aus sternalem Knorpelgewebe und wurde mittels des SV40 large T Antigen unter Nutzung des retroviralen neomycin-resistent pZipNeoSV(X) Vektors immortalisiert und ist bereits unzählige Male passagiert worden (71). Dadurch lässt

sich eine teilweise Dedifferenzierung der Zellen nicht sicher ausschließen. Dies limitiert die Ergebnisse ebenso, wie auch das ungehemmte Wachstum der C28/I2 Zellen in der als Kontrollgruppe dienlichen statischen 1 g Zellkultur. Bereits morphologisch (vgl. Abbildung 4K) sind phänotypische Merkmale von Chondrozyten reduziert und eine sehr hohe Zelldichte merklich. Für weitere Experimente sollte eine interne Kontrolle der für einen Langzeitversuch statisch kultivierten C28/I2 Zellen vorangestellt werden. Ferner ergaben frühere Arbeiten, wie im Absatz 4.3. beschrieben, Hinweise auf das unterschiedliche Verhalten von artikulärem und sternalen Knorpel bei Stimulation durch geänderte Gravitationsbedingungen (114).

4.5. Protein- und Genexpression von murinen Knorpelzellen in simulierter Mikrogravitation

Betrachtet man in Hinblick auf die observierten Veränderungen nun Ergebnisse, die im Tiermodell erzielt wurden, ist folgendes zu bemerken:

In den Versuchen mit murinen Knorpelzellen im Rahmen dieser Arbeit konnte bei der *MMP13*-Expression eine signifikante Steigerung nachgewiesen werden (Abbildung 11H). Dieser Befund ist kohärent mit den Beobachtungen von Kwok et al. (126). Das Team hing C57BL/6J Mäuse an den Hinterläufen auf, um die Hüftlast zu minimieren. Es zeigte sich eine signifikant höhere MMP-13 Proteinkonzentration und Reduktion des Knorpelvolumens (126). In einem ähnlich konzipierten Immobilisationsversuch an männlichen Sprague-Dawley Ratten konnten Leong et. al bereits nach 6 Stunden eine erhöhte *MMP3*-RNA-Expression nachweisen. Dieser Effekt betraf besonders die oberflächliche Knorpelzone, in welche Chondrozyten vorrangig auftreten, und konnte durch eine Stunde passiver Mobilisation signifikant reduziert werden. Dies deutet auf die Rolle von mechanischen Kräften auf den Knorpel hin (127). Demgegenüber zeigte die Bion-M1 Weltraummission im sternalen Knorpel von Mäusen desselben Stammes nach 30 Tagen realer Mikrogravitation eine Abnahme der *MMP13*-, *MMP9*- und *COL1A1*-Genexpression (114). In Hinblick auf die bereits bei den humanen Chondrozyten beobachteten Unterschieden zwischen sternalem Knorpelgewebe und Knorpel echter Gelenke, scheinen hier ähnliche Regulationsmechanismen zu existieren. Gleichzeitig ist eine Differenz zwischen der Lastreduktion unter

Erdgravitation und der Lastreduktion durch Gravitationsunterschiede zu bemerken und kann eine Erklärung für die verschiedenen Expressionsmuster bieten.

Die weiteren untersuchten Genexpressionen verblieben ohne signifikante Veränderungen. Eine Ursache hierfür kann in der geringen Zahl untersuchter Proben liegen. Betrachtet man die Tendenzen der mRNA-Expressionen, könnte die verminderte Transkription von *RUNX2* ursächlich für die mRNA-Veränderungen von *COL1A1* und *MMP13* sein.

Das Übertragen von Schlussfolgerungen aus Tierexperimenten ist jedoch kritisch zu bewerten, auch wenn die dargestellten Studien der Tiermodelle regulatorische Prozesse in Chondrozyten beschreiben, auf welche auch die Ergebnisse dieser Arbeit hinweisen. So fanden Sebastian et al. (128) bei der Untersuchung von murinen und humanen Chondrozyten-Subpopulationen zwar Gemeinsamkeiten, jedoch vor allem in frühen Stadien der Arthroseentwicklung auch Unterschiede. Eine weitere Studie konnte nach differentieller Transkriptionsanalyse schlussfolgern, dass Kernkomponenten der chondrogenen Entwicklung in humanen und murinen Chondrozyten vergleichbar sind. Jedoch ließ sich bei murinen Zellen eine höhere Expression Zellzyklus-regulierender Gene nachweisen (129). Die Autoren schlussfolgerten ein höheres regeneratives Potential der murinen Chondrozyten. Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene niedrigere Apoptose-Rate der mCH im Vergleich zu den C28/I2-Zellen unterstützt diese Aussage.

4.6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dreidimensionales Knorpelgewebe gezüchtet werden. Die verwendete Methode und das entstandene Gewebe können zuverlässig für weitere gezielte Forschung genutzt werden. Nachgewiesene Regulationsfaktoren wie *MMP13*, *SOX9* und *RUNX3*, sollten in zukünftigen Projekten weiter untersucht werden. In Vorausschau auf die Translation der Ergebnisse sollten dabei möglichst humane, artikuläre Zellreihen Verwendung finden. Für die künftige Anwendung in der Therapie von Knorpelerkrankungen ist das produzierte Gewebe auf mechanische Eigenschaften und Widerstandsfähigkeit zu prüfen. Auch die inflammatorische Umgebung, welche Transplantate bei Patienten ausgesetzt sind, stellt Herausforderungen dar (130). In folgenden Arbeiten sollten diese Stressoren untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Das Tissue Engineering von Knorpel ist ein zukunftssträchtiges Themengebiet der translationalen Medizin. Eine Möglichkeit der *de novo* Genese von Knorpelgewebe ist die chondrozytäre Stimulation durch simulierte Mikrogravitation. Sowohl in Hinblick auf das steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung der Industrienationen als auch auf zukünftige Missionen und die geplante Besiedlung von Mars und Mond, sind neue Techniken und Therapieansätze zur Behandlung von Knorpeldefekten oder arthrotischem Gelenkverschleiß unerlässlich.

Die vorliegende Dissertation hat das Ziel die von der $s\text{-}\mu\text{g}$ abhängige Knorpelsynthese anhand unterschiedlicher Zelltypen nachzuweisen und zelltypunabhängige Veränderungen in Bezug auf die Protein- und Genexpression zu ermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Verwendung einer RWV innerhalb von 14 Tagen Neoknorpel aus primären und immortalisierten humanen sowie murinen Chondrozyten gebildet. Es zeigt sich, dass durch die RWV simulierte Mikrogravitation grundsätzlich in der Lage ist, trägermaterialfrei dichtes Knorpelgewebe zu produzieren. Dieses Gewebe weist sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene alle spezifischen Charakteristiken auf. Dies wurde mit Hilfe von histologischen Verfahren und qPCR nachgewiesen. Daher scheint diese Methode für die *in-vitro* Herstellung von Knorpelgewebe tauglich und als Tool für das Tissue Engineering geeignet zu sein.

Der Nachweis von zelltypunabhängigen Veränderungen durch die RWV-Stimulation ist jedoch anhand nicht artikulärer, nicht humaner Zelltypen aufgrund von Differenzen in Zellzyklus- oder Matrixregulation nicht sicher zu erbringen. Regulationsfaktoren wie MMP13, SOX9 und RUNX3, sollten in zukünftigen Projekten gezielt unter Nutzung möglichst anatomisch korrekter Modelle untersucht werden, da sie sich im Rahmen dieser Arbeit positiv auf die Chondrogenese auswirkten.

6. Summary

The tissue engineering of cartilage is a seminal topic of translative medicine. One possible way to *de novo* generate cartilage tissue is stimulating chondrocytes by using simulated microgravity (s- μ g). Not only regarding the increasing average age of the population of industrialized nations, but also in view of future missions and the planned colonization of Mars and the Moon, new techniques and therapeutic approaches for the treatment of cartilage defects or osteoarthritic joint disease are imperative.

The aim of this dissertation is to examine s- μ g-dependent cartilage synthesis using different cell types and to assess cell type-independent changes in protein and gene expression.

This project used a '*rotating wall vessel*' bioreactor to produce neocartilage from primary and immortalized human and murine chondrocytes within 14 days. It was shown that microgravity simulated using the RWV is fundamentally capable of producing dense cartilage tissue without carrier material. This tissue exhibits all cartilage specific characteristics at both mRNA and protein level. Evidence for this was provided by histological methods and qPCR. This method therefore appears to be suitable for the *in-vitro* production of cartilage tissue and as a tool for tissue engineering.

However, evidence of cell type-independent changes caused by RWV stimulation cannot be reliably obtained using non-articular, non-human cell types due to differences in cell cycle or matrix regulation. Regulatory factors such as MMP13, SOX9 and RUNX3 should be specifically investigated in future projects using models that are as anatomically correct as possible, since these factors had a positive effect on chondrogenesis in this research.

7. Literaturverzeichnis

1. Vega SL, Kwon MY, Burdick JA: Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 33. 59–75 (2017)
2. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA: The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 1. 461–468 (2009)
3. Buckwalter JA: Articular cartilage. *Instr Course Lect.* 32. 349–370 (1983)
4. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D: *Anatomie.* 5. Aufl. Thieme, Stuttgart (2020)
5. Lüllmann-Rauch R, Asan E: *Taschenbuch Histologie.* 5. Aufl. Georg Thieme Verlag. pp.149 - 158, Stuttgart New York (2015)
6. Posniak S, Chung JH, Liu X, Mukherjee P, Wallace GG: The importance of elastin and its role in auricular cartilage tissue engineering. *Bioprinting.* 32. e00276 (2023)
7. Chen S, Fu P, Wu H, Pei M: Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell Tissue Res.* 370. 53–70 (2017)
8. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M: Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biology.* 16. 457–470 (1998)
9. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F: The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 39. 25–32 (2014)
10. Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Granados MM, Domínguez JM: Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects. *International Journal of Molecular Sciences.* 22 (2021)
11. Alford JW, Cole BJ: Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *The American Journal of Sports Medicine.* 33. 295–306 (2005)
12. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* 9. Aufl. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2014)
13. Söder S, Hambach L, Lissner R, Kirchner T, Aigner T: Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage.* 10. 464–470 (2002)
14. Scott JE: Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat.* 187 (Pt 2). 259–269 (1995)
15. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26. 239–257 (1972)

16. Lotz Mea: Mechanisms of chondrocyte apoptosis
17. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 4. 953–961 (1993)
18. Hwang H, Kim H: Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 16. 26035–26054 (2015)
19. Zamli Z, Sharif M: Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int J Rheum Dis*. 14. 159–166 (2011)
20. Roach HI, Aigner T, Kouri JB: Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*. 9. 265–277 (2004)
21. Institute for Health Metrics and Evaluation (22.03.2024) Global Burden of 369 Diseases and Injuries in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>, 22.03.2024
22. Long H, Liu Q, Yin H, Wang K, Diao N, Zhang Y, Lin J, Guo A: Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis & Rheumatology*. 74. 1172–1183 (2022)
23. Wirth CJ, Mutschler W, Kohn D, Pohlemann T: Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag. pp.302 - 361, Stuttgart (2014)
24. Blum HE, Müller-Wieland D: Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag KG. pp.1077-1118, Stuttgart (2020)
25. March LM, Bachmeier CJ: Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillière's Clinical Rheumatology*. 11. 817–834 (1997)
26. Yu SP, Hunter DJ: Managing osetoarthritis. *Australian Prescriber*. 38. 115–119 (2015)
27. Nowaczyk A, Szwedowski D, Dallo I, Nowaczyk J: Overview of First-Line and Second-Line Pharmacotherapies for Osteoarthritis with Special Focus on Intra-Articular Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 23. 1566 (2022)
28. Kraeutler MJ, Belk JW, Purcell JM, McCarty EC: Microfracture Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Systematic Review of 5-Year Outcomes. *The American Journal of Sports Medicine*. 46. 995–999 (2017)
29. Iordache E, Robertson EL, Hirschmann A, Hirschmann MT: Typical MRI-pattern suggests peak maturation of the ACI graft 2 years after third-generation ACI: a systematic review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 29. 3664–3677 (2020)
30. Migliorini F, Maffulli N, Baroncini A, Knobe M, Tingart M, Eschweiler J: Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus autologous matrix-induced chondrogenesis for chondral defects of the talus: a systematic review. *British Medical Bulletin*. 138. 144–154 (2021)

31. Shimomura K, Ando W, Hart DA, Yonetani Y, Horibe S, Nakamura N: Five-Year Outcomes After Implantation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Knee Chondral Lesions. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 11 (2023)
32. Eschen C, Kaps C, Widuchowski W, Fickert S, Zinser W, Niemeyer P, Roël G: Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria. *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2. 100033 (2020)
33. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK: Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 7. 300–304 (1997)
34. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 331. 889–895 (1994)
35. Stierstadt K, Hering WT, Dorfmueller T: *Mechanik, Relativität, Wärme*. De Gruyter (1998)
36. Albrecht-Buehler G: The simulation of microgravity conditions on the ground. *ASGSB Bull*. 5. 3–10 (1992)
37. Carter DR: Mechanical loading history and skeletal biology. *Journal of Biomechanics*. 20. 1095–1109 (1987)
38. Abby Graf (03/01/2024) 5 Hazards of Human Spaceflight - NASA. <https://www.nasa.gov/hrp/hazards/>, 27.03.2024
39. Patel ZS, Brunstetter TJ, Tarver WJ, Whitmire AM, Zwart SR, Smith SM, Huff JL: Red risks for a journey to the red planet: The highest priority human health risks for a mission to Mars. *npj Microgravity*. 6. 33 (2020)
40. Vico L, Collet P, Guignandon A, Lafage-Proust MH, Thomas T, Rehaillia M, Alexandre C: Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet*. 355. 1607–1611 (2000)
41. Ganse B, Cucchiari M, Madry H: Joint Cartilage in Long-Duration Spaceflight. *Biomedicine*. 10. 1356 (2022)
42. Olson JL, Atala A, Yoo JJ: Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J*. 47. 1–13 (2011)
43. Fani N, Peshkova M, Bikmulina P, Golroo R, Timashev P, Vosough M: Fabricating the cartilage: recent achievements. *Cytotechnology*. 75. 269–292 (2023)
44. McGivern S, Boutouil H, Al-Kharusi G, Little S, Dunne NJ, Levingstone TJ: Translational Application of 3D Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *Bioengineering*. 8. 144 (2021)
45. Perera K, Ivone R, Natekin E, Wilga CA, Shen J, Menon JU: 3D Bioprinted Implants for Cartilage Repair in Intervertebral Discs and Knee Menisci. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9 (2021)

46. Huang J, Xiong J, Wang D, Zhang J, Yang L, Sun S, Liang Y: 3D Bioprinting of Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Gels*. 7. 144 (2021)
47. Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PCM, Geest M de, Hauslage J, Hilbig R, Hill RJA, Lebert M, Medina FJ, Vagt N, Ullrich O, van Loon JJWA, Hemmersbach R: Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. 13. 1–17 (2013)
48. Aleshcheva G, Bauer J, Hemmersbach R, Slumstrup L, Wehland M, Infanger M, Grimm D: Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 119 Suppl 3. 26–33 (2016)
49. van Loon JJ: Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Advances in Space Research*. 39. 1161–1165 (2007)
50. Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA: Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: An application of simulated microgravity. *Journal of Tissue Culture Methods*. 14. 51–57 (1992)
51. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG: Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100. 14683–14688 (2003)
52. Phelan: Customized rotating wall vessel bioreactors produce improved retinal organoids with reduced operational costs and less frequent experimental failure. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 60. 3316 (2019)
53. Reina-Mahecha A, Beers MJ, van der Veen HC, Zuhorn IS, van Kooten TG, Sharma PK: A Review of the Role of Bioreactors for iPSCs-Based Tissue-Engineered Articular Cartilage. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 20. 1041–1052 (2023)
54. David A. Wolf, Clarence Sams, and Ray P Schwarz: High-Aspect-Ratio Rotating Cell-Culture Vessel. *NASA Tech Briefs*. 16. 150–151 (1992)
55. Hammond T, Allen P, Birdsall H: Is There a Space-Based Technology Solution to Problems with Preclinical Drug Toxicity Testing? *Pharm Res*. 33. 1545–1551 (2016)
56. Hammond TG, Hammond JM: Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281. F12-25 (2001)
57. Moroni L, Tabury K, Stenuit H, Grimm D, Baatout S, Mironov V: What can biofabrication do for space and what can space do for biofabrication? *Trends in Biotechnology*. 40. 398–411 (2022)
58. Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, Richter P, Prasad B, Bauer J, Egli M, Kopp S, Lebert M, Krüger M: The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 9. 882–894 (2020)

59. Ma X, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hübner N, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Genomic Approach to Identify Factors That Drive the Formation of Three-Dimensional Structures by EA.hy926 Endothelial Cells. *PLoS One*. 8. e64402 (2013)
60. Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR, Vunjak-Novakovic G: Tissue engineering of cartilage in space. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94. 13885–13890 (1997)
61. Stamenković V, Keller G, Nesic D, Cogoli A, Grogan SP: Neocartilage Formation in 1 g, Simulated, and Microgravity Environments: Implications for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 16. 1729–1736 (2010)
62. Freed LE, Vunjak-Novakovic G: Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 33. 381–385 (1997)
63. Chang TT, Hughes-Fulford M: Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates. *Biomaterials*. 35. 2162–2171 (2014)
64. Dittrich A, Grimm D, Sahana J, Bauer J, Krüger M, Infanger M, Magnusson NE: Key Proteins Involved in Spheroid Formation and Angiogenesis in Endothelial Cells After Long-Term Exposure to Simulated Microgravity. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 45. 429–445 (2018)
65. Wehland M, Steinwerth P, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lützenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D: Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *International Journal of Molecular Sciences*. 21. 9596 (2020)
66. Aleshcheva G, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, Infanger M, Bauer J, Grimm D: Changes in Morphology, Gene Expression and Protein Content in Chondrocytes Cultured on a Random Positioning Machine. *PLoS One*. 8. e79057 (2013)
67. Baker TL, Goodwin TJ: Three-dimensional culture of bovine chondrocytes in rotating-wall vessels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 33. 358–365 (1997)
68. Mellor LF, Baker TL, Brown RJ, Catlin LW, Oxford JT: Optimal 3D Culture of Primary Articular Chondrocytes for Use in the Rotating Wall Vessel Bioreactor. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 85. 798–804 (2014)
69. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Schlegel W: Collagen Expression in Tissue Engineered Cartilage of Aged Human Articular Chondrocytes in a Rotating Bioreactor. *Int J Artif Organs*. 26. 319–330 (2003)
70. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vécsei V: Chondrogenesis of Aged Human Articular Cartilage in a Scaffold-Free Bioreactor. *Tissue Eng*. 9. 1215–1226 (2003)
71. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, Apperley JF: Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 94. 2307–2316 (1994)

72. Goodwin TJ, Prewett TL, Wolf DA, Spaulding GF: Reduced shear stress: A major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity. *J Cell Biochem.* 51. 301–311 (1993)
73. Steinwerth P, Bertrand J, Sandt V, Marchal S, Sahana J, Bollmann M, Schulz H, Kopp S, Grimm D, Wehland M: Structural and Molecular Changes of Human Chondrocytes Exposed to the Rotating Wall Vessel Bioreactor. *Biomolecules.* 14 (2023)
74. Mayer P: Über das Färben mit Hämatoxylin. *Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel.* 170–186 (1891 - 1893)
75. Kopp S, Slumstrup L, Corydon TJ, Sahana J, Aleshcheva G, Islam T, Magnusson NE, Wehland M, Bauer J, Infanger M, Grimm D: Identifications of novel mechanisms in breast cancer cells involving duct-like multicellular spheroid formation after exposure to the Random Positioning Machine. *Scientific reports.* 6 (2016)
76. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR: Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 11. 447–455 (1979)
77. Nalesso G, Thorup A-S, Eldridge SE, Palma A de, Kaur A, Peddireddi K, Blighe K, Rana S, Stott B, Vincent TL, Thomas BL, Bertrand J, Sherwood J, Fioravanti A, Pitzalis C, Dell'Accio F: Calcium calmodulin kinase II activity is required for cartilage homeostasis in osteoarthritis. *Scientific reports.* 11 (2021)
78. BRYAN JH: Differential staining with a mixture of safranin and fast green FCF. *Stain Technol.* 30. 153–157 (1955)
79. Meyer F, Dittmann A, Kornak U, Herbster M, Pap T, Lohmann CH, Bertrand J: Chondrocytes From Osteoarthritic and Chondrocalcinosis Cartilage Represent Different Phenotypes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 9 (2021)
80. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz R, Gong J, Darzynkiewicz Z: DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol.* 1. 639–648 (1992)
81. Stolberg-Stolberg J, Boettcher A, Sambale M, Stuecker S, Sherwood J, Raschke M, Pap T, Bertrand J: Toll-like receptor 3 activation promotes joint degeneration in osteoarthritis. *Cell Death & Disease.* 13 (2022)
82. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6. 986–994 (1996)
83. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* 25. 402–408 (2001)
84. (30/03/2024)Primer designing tool.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, 30.03.2024
85. Snel B: STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research.* 28. 3442–3444 (2000)

86. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*. 51. D523-D531 (2023)
87. Häder D-P, Braun M, Grimm D, Hemmersbach R: Gravireceptors in eukaryotes—a comparison of case studies on the cellular level. *npj Microgravity*. 3 (2017)
88. Cialdai F, Brown AM, Baumann CW, Angeloni D, Baatout S, Benchoua A, Bereiter-Hahn J, Bottai D, Buchheim J-I, Calvaruso M, Carnero-Diaz E, Castiglioni S, Cavalieri D, Ceccarelli G, Choukér A, Ciofani G, Coppola G, Cusella G, Degl'Innocenti A, Desaphy J-F, Fripiat J-P, Gelinsky M, Genchi G, Grano M, Grimm D, Guignandon A, Hahn C, Hatton J, Herranz R, Hellweg CE, Iorio CS, Karapantsios T, van Loon J, Lulli M, Maier J, Malda J, Mamaca E, Morbidelli L, van Ombergen A, Osterman A, Ovsianikov A, Pampaloni F, Pavezlorie E, Pereda-Campos V, Przybyla C, Puhl C, Rettberg P, Risaliti C, Rizzo AM, Robson-Brown K, Rossi L, Russo G, Salvetti A, Santucci D, Sperl M, Strollo F, Tabury K, Tavella S, Thielemann C, Willaert R, Szewczyk NJ, Monici M: How do gravity alterations affect animal and human systems at a cellular/tissue level? *npj Microgravity*. 9 (2023)
89. Rim YA, Nam Y, Ju JH: The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020)
90. Beheshti A, McDonald JT, Hada M, Takahashi A, Mason CE, Mognato M: Genomic Changes Driven by Radiation-Induced DNA Damage and Microgravity in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 22. 10507 (2021)
91. Riwaldt S, Pietsch J, Sickmann A, Bauer J, Braun M, Segerer J, Schwarzwälder A, Aleshcheva G, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Identification of proteins involved in inhibition of spheroid formation under microgravity. *PROTEOMICS*. 15. 2945–2952 (2015)
92. Prasad B, Grimm D, Strauch SM, Erzinger GS, Corydon TJ, Lebert M, Magnusson NE, Infanger M, Richter P, Krüger M: Influence of Microgravity on Apoptosis in Cells, Tissues, and Other Systems In Vivo and In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020)
93. Unsworth BR, Lelkes PI: Growing tissues in microgravity. *Nature Medicine*. 4. 901–907 (1998)
94. Jessup JM, Goodwin TJ, Spaulding G: Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host—tumor interactions in human neoplasia. *J Cell Biochem*. 51. 290–300 (1993)
95. Becker: Women's health issues and space-based medical technologies. *Earth Space Rev*. 3. 15 (1994)
96. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R: Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem*. 51. 257–264 (1993)
97. Conza: Tissue engineering in space. *J. Gravit. Physiol*. 8. P17 (2001)
98. Cui Y, Liu W, Zhao S, Zhao Y, Dai J: Advances in Microgravity Directed Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 12. e2202768 (2023)

99. Gu J, Lu Y, Li F, Qiao L, Wang Q, Li N, Borgia JA, Deng Y, Lei G, Zheng Q: Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death & Disease*. 5. e1469-e1469 (2014)
100. Komori T: Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*. 149. 313–323 (2018)
101. Aleshcheva G, Wehland M, Sahana J, Bauer J, Corydon TJ, Hemmersbach R, Frett T, Egli M, Infanger M, Grosse J, Grimm D: Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight maneuvers could be prevented by up-regulation of BMP-2 and SOX-9. *The FASEB Journal*. 29. 2303–2314 (2015)
102. Wehland M, Aleshcheva G, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hemmersbach R, Braun M, Ma X, Frett T, Warnke E, Riwaldt S, Pietsch J, Corydon TJ, Infanger M, Grimm D: Differential gene expression of human chondrocytes cultured under short-term altered gravity conditions during parabolic flight maneuvers. *Cell Communication and Signaling*. 13 (2015)
103. Thomas AC, Hubbard-Turner T, Wikstrom EA, Palmieri-Smith RM: Epidemiology of Posttraumatic Osteoarthritis. *J Athl Train*. 52. 491–496 (2017)
104. Héraud F, Héraud A, Harmand MF: Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 59. 959–965 (2000)
105. Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L: Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis & Rheumatism*. 44. 1304–1312 (2001)
106. Ulbrich C, Westphal K, Pietsch J, Winkler HDF, Leder A, Bauer J, Kossmehl P, Grosse J, Schoenberger J, Infanger M, Egli M, Grimm D: Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity. *Cell Physiol Biochem*. 25. 551–560 (2010)
107. Park H, Kong SY, Kim HW, Yang IH: Altered cellular kinetics in growth plate according to alterations in weight bearing. *Yonsei Med J*. 53. 618–624 (2012)
108. Zhang X-A, Kong H: Mechanism of HIFs in osteoarthritis. *Front Immunol*. 14. 1168799 (2023)
109. Hu Q, Ecker M: Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22. 1742 (2021)
110. Ogawa H, Kozhemyakina E, Hung H-H, Grodzinsky AJ, Lassar AB: Mechanical motion promotes expression of Prg4 in articular cartilage via multiple CREB-dependent, fluid flow shear stress-induced signaling pathways. *Genes & Development*. 28. 127–139 (2014)
111. Wiegertjes R, van de Loo FAJ, Blaney Davidson EN: A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis. *Rheumatology*. 59. 2681–2694 (2020)

112. Jacob J, Aggarwal A, Aggarwal A, Bhattacharyya S, Kumar V, Sharma V, Sahni D: Senescent chondrogenic progenitor cells derived from articular cartilage of knee osteoarthritis patients contributes to senescence-associated secretory phenotype via release of IL-6 and IL-8. *Acta Histochem.* 124. 151867 (2022)
113. Song H, Park K-H: Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Seminars in Cancer Biology.* 67. 12–23 (2020)
114. Fitzgerald J, Endicott J, Hansen U, Janowitz C: Articular cartilage and sternal fibrocartilage respond differently to extended microgravity. *npj Microgravity.* 5 (2019)
115. Tauber S, Lauber BA, Paulsen K, Layer LE, Lehmann M, Hauschild S, Shepherd NR, Polzer J, Segerer J, Thiel CS, Ullrich O: Cytoskeletal stability and metabolic alterations in primary human macrophages in long-term microgravity. *PLoS One.* 12. e0175599 (2017)
116. Roughley PJ, Mort JS: The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics.* 1 (2014)
117. Takahata Y, Hagino H, Kimura A, Urushizaki M, Yamamoto S, Wakamori K, Murakami T, Hata K, Nishimura R: Regulatory Mechanisms of Prg4 and Gdf5 Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences.* 23. 4672 (2022)
118. Li Y, Xiao W, Sun M, Deng Z, Zeng C, Li H, Yang T, Li L, Luo W, Lei G: The Expression of Osteopontin and Wnt5a in Articular Cartilage of Patients with Knee Osteoarthritis and Its Correlation with Disease Severity. *BioMed Research International.* 2016. 1–7 (2016)
119. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, La Castruita-De Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML: The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 21. 9739 (2020)
120. Nagata K, Hojo H, Chang SH, Okada H, Yano F, Chijimatsu R, Omata Y, Mori D, Makii Y, Kawata M, Kaneko T, Iwanaga Y, Nakamoto H, Maenohara Y, Tachibana N, Ishikura H, Higuchi J, Taniguchi Y, Ohba S, Chung U, Tanaka S, Saito T: Runx2 and Runx3 differentially regulate articular chondrocytes during surgically induced osteoarthritis development. *Nature Communications.* 13 (2022)
121. Liu S, Deng Z, Chen K, Jian S, Zhou F, Yang Y, Fu Z, Xie H, Xiong J, Zhu W: Cartilage tissue engineering: From proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review). *Molecular Medicine Reports.* 25 (2022)
122. Cucchiaroni M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H: Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis & Rheumatism.* 56. 158–167 (2007)
123. Peacock JD, Huk DJ, Ediriweera HN, Lincoln J: Sox9 Transcriptionally Represses Spp1 to Prevent Matrix Mineralization in Maturing Heart Valves and Chondrocytes. *PLoS One.* 6. e26769 (2011)

124. Schuerwegh A, Dombrecht E, Stevens W, van Offel J, Bridts C, Clerck L de: Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and Cartilage*. 11. 681–687 (2003)
125. Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A, Crombrughe B de: The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development*. 16. 2813–2828 (2002)
126. Kwok AT, Moore JE, Rosas S, Kerr BA, Andrews RN, Nguyen CM, Lee J, Furdui CM, Collins BE, Munley MT, Willey JS: Knee and Hip Joint Cartilage Damage from Combined Spaceflight Hazards of Low-Dose Radiation Less than 1 Gy and Prolonged Hindlimb Unloading. *Radiation Research*. 191. 497 (2019)
127. Leong DJ, Gu XI, Li Y, Lee JY, Laudier DM, Majeska RJ, Schaffler MB, Cardoso L, Sun HB: Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biology*. 29. 420–426 (2010)
128. Sebastian A, McCool JL, Hum NR, Murugesk DK, Wilson SP, Christiansen BA, Loots GG: Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptomic Heterogeneity and Post-Traumatic Osteoarthritis-Associated Early Molecular Changes in Mouse Articular Chondrocytes. *Cells*. 10 (2021)
129. Ferguson GB, van Handel B, Bay M, Fiziev P, Org T, Lee S, Shkhyan R, Banks NW, Scheinberg M, Wu L, Saitta B, Elphinstone J, Larson AN, Riester SM, Pyle AD, Bernthal NM, Mikkola HK, Ernst J, van Wijnen AJ, Bonaguidi M, Evseenko D: Mapping molecular landmarks of human skeletal ontogeny and pluripotent stem cell-derived articular chondrocytes. *Nature Communications*. 9. 3634 (2018)
130. Nordberg RC, Bielajew BJ, Takahashi T, Dai S, Hu JC, Athanasiou KA: Recent advancements in cartilage tissue engineering innovation and translation. *Nat Rev Rheumatol*. 20. 323–346 (2024)

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 - Masson's Trichrom Färbung eines gesunden hyalinen Knorpels	12
Abbildung 2 - Schematische Darstellung der beschriebenen Reaktoren für die Simulation von Mikrogravitation	21
Abbildung 3: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaues anhand der hCHON Zellreihe und Schema des zeitlichen Aufbaus der gesamten Versuchsreihe.	32
Abbildung 4 – Ergebnisse der Chondrozytenkultivierung unter s- μ g in der RWV.....	40
Abbildung 5 - Repräsentative Aufnahmen der gefärbten Sphäroide der C28/I2 Chondrozyten unter 7- bzw. 14-tägiger RWV-Exposition	41
Abbildung 6 - Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen der C28/I2 Chondrozyten nach 3-, 7- bzw. 14-tägiger RWV-Exposition.....	42
Abbildung 7 – Nachweis von Zelltod über den 14-tägigen Betrachtungszeitraum....	43
Abbildung 8 – Immunfluoreszenzfärbungen von murinen Chondrozyten	44
Abbildung 9 – Normierte mRNA-Expression der C28/I2 Zelllinie nach 3-, 7-, und 14-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR.....	46
Abbildung 10 – relativierte mRNA-Expression der primären humanen Chondrozyten nach 14-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR.....	48
Abbildung 11 - relativierte mRNA-Expression der murinen Chondrozyten nach 7-tägiger RWV-Exposition, nachgewiesen mittels qPCR.....	49
Abbildung 12 – Überblick über die Genexpression und STRING Proteininteraktionen der qPCR-Analysedaten der Sphäroide der C28/I2 Zelllinie bzw. der primären humanen Chondrozyten	51
Tabelle 1 - verwendete Geräte und Software	24
Tabelle 2 - verwendete Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3 - verwendete Chemikalien	26
Tabelle 4 - verwendete Primär- und Sekundärantikörper	27
Tabelle 5 - qPCR Primersequenzen.....	27

I Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Prof. Dr. Daniela Grimm dafür danken, mir das Forschungsprojekt überlassen und für die Umsetzung nötige Ressourcen zur Verfügung gestellt zu haben. Ich danke vielmals für die geduldige, engmaschige und immer hilfsbereite Betreuung.

Darüber hinaus möchte ich Frau Prof. Dr. Jessica Bertrand dafür danken, mir zusätzliche Ressourcen Ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und mich bei jeglichen Fragen allzeit unterstützt zu haben.

Mein Dank gebührt ebenso dem Team der Abteilung Translationale und Regenerative Medizin, vor allem Dr. Markus Wehland, Dr. Markus Krüger, Dr. Herbert Schulz, Dr. Sascha Kopp, sowie Daniela Melnik, M.Sc. und Vivian Sandt. Sie gaben mir Hilfestellungen bei der Laboreinarbeitung, unterstützten bei Analysen und begleiteten mich durch das Projekt.

Ein besonderer Dank gilt dem Team der orthopädischen Forschung, welches mich herzlich aufgenommen hat. Hervorzuheben sind der Austausch mit Dr. Miriam Bollmann, die geduldige Einarbeitung in die Histologie durch Anja Schröder, und die freundliche Unterstützung von Carolin Schneider und Mandy Könecke.

II Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von simulierter Mikrogravitation auf die trägerfreie de novo Chondrogenese aus humanen und murinen primären Chondrozyten

in der Abteilung für Mikrogravitation und Translationale Regenerative Medizin

mit Unterstützung durch den Forschungsbereich Experimentelle Orthopädie der orthopädischen Universitätsklinik

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die
Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den

Unterschrift

III Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.