

Aus der
KLINIK FÜR UNFALL- UND WIEDERHERSTELLUNGSSCHIRURGIE
der **MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN**
am Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Effekte einer Interleukin-10 Überexpression in humanen Gelenkchondrozyten und Interaktion von Interleukin-10 mit Tumor Nekrose Faktor- α

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von **RICCARDA MÜLLER**
aus **SAN CHRISTOBAL DE LA LAGUNA DE TENERIFE**

GUTACHTER 1: Prof. Dr. med. W. Ertel

2: Prof. Dr. rer. nat. Th. Pufe

3: Prof. Dr. med. H. Madry

DATUM DER PROMOTION: 18. September 2009

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN

ABSTRACT	1
EINLEITUNG	2
ZIELSTELLUNG.....	2
METHODEN	3
Chondrozytenisolierung und -kultur.....	3
Stimulation mit rekombinanten Zytokinen.....	3
Adenovirale Transduktion.....	3
hIL-10 ELISA	4
Transmissionselektronenmikroskopie	4
Immunzytochemie.....	4
CFDA-SE Proliferations-Assay.....	4
Proteinisolierung.....	4
Western-Blot	5
Caspase-Assay	5
Real-time-PCR.....	5
Statistik	5
ERGEBNISSE	6
IL-10 beeinflusst die Expression von Knorpelmatrixproteinen.....	6
IL-10 reguliert die Expression von matrixabbauenden Enzymen.....	6
IL-10 reduziert zytokinabhängig die TNF- α induzierte Expression entzündlicher Zytokine..	7
IL-10 moduliert pro-apoptotische Effekte von TNF- α	7
IL-10 Überexpressionsdauer und Homöostase von Chondrozyten	7
DISKUSSION.....	8
ABKÜRZUNGEN	12
LITERATUR.....	12
ANTEILSERKLÄRUNG	15
AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN	17
John T, Mueller RD et al., 2007; Cytokine	17
Mueller RD et al., 2008; Clinical Medicine: Arthritis and Musculoskeletal Disorders	18
Mueller RD et al., 2009; Cytokine	19
LEBENSLAUF.....	20
PUBLIKATIONSLISTE	21
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	23
DANKSAGUNG	24

ABSTRACT

Die Arthrose ist eine degenerative Gelenkknorpelerkrankung, die durch eine fortschreitende irreversible Knorpeldestruktion gekennzeichnet ist. Vielfältige katabole Prozesse, die im arthrotischen Knorpel beschrieben sind, werden durch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β und den Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α vermittelt. Eine Hemmung der Neusynthese extrazellulärer Knorpelmatrixproteine, eine vermehrte Freisetzung von katabolen Enzymen und entzündlichen Zytokinen sowie apoptotische Prozesse in den Chondrozyten. In diesem Projekt wurde daher untersucht, welche Auswirkungen das immunregulatorische Zytokin IL-10 auf die Zellbiologie der Chondrozyten hat. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob IL-10 die katabolen Effekte, die von TNF- α in Knorpelzellkulturen induziert werden, beeinflussen kann. Daher wurde die Genexpression von knorpelspezifischen Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, Aggrekan), Enzymen die den Knorpelmatrixabbau vermitteln (Matrix Metalloproteinasen [MMP-3 und MMP-13]) und wichtigen inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10) untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluß von IL-10 auf Apoptosemarker (Caspaseaktivitäten, bax/bcl-2 Synthese) in Chondrozyten bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten durch Stimulation humaner Chondrozytenkulturen mit rekombinantem humanem TNF- α , IL-10 und in einem adenoviralen IL-10 Überexpressionsmodell. In 3D-Knorpelzellkulturen wurde daher auch parallel der Einfluss der IL-10 Überexpression auf den differenzierten Phänotyp der Chondrozyten über zwei Wochen überprüft. Die Ergebnisse zeigten: Trotz einer stimulatorischen Wirkung von IL-10 auf die Kollagen Typ II Genexpression blieb die durch TNF- α supprimierte Expression dieses essentiellen Knorpelmatrixbestandteils durch IL-10 kaum beeinflusst. Allerdings konnte die durch TNF- α signifikant verminderte Genexpression von Aggrekan wieder aufgehoben werden. Ähnliche antagonistische Tendenzen zwischen IL-10 und TNF- α wurden auch hinsichtlich der Genexpression von MMP-3 und -13 nachgewiesen. Auch konnte die durch TNF- α vermehrte IL-1 β , TNF- α und IL-6 Expression durch IL-10 gesenkt werden. IL-10 hemmte zudem die TNF- α induzierte Apoptose über eine Verminderung der Aktivitäten von Caspasen, die in intrinsische und extrinsische mitochondriale Apoptosewege eingebunden sind und über ein signifikant günstigeres Verhältnis der regulatorischen Proteine bax und bcl-2. IL-10 ist daher nicht in der Lage, die von TNF- α induzierten katabolen Prozesse in Chondrozytenkulturen aufzuheben, zeigt jedoch einige antagonistische und damit chondroprotektive Effekte. Transduzierte Chondrozyten exprimierten das Transgen über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen in den 3D-Kulturen und eine IL-10 Überexpression übte hier keine katabolen Wirkungen auf die Kollagen Typ II, Aggrekan, Kollagen Typ I, Fibronectin und β 1-Integrin Proteinexpression aus.

EINLEITUNG

Eine Grundvoraussetzung für den Erhalt des physiologischen Gleichgewichts des Knorpels ist die Fähigkeit der Chondrozyten, die Biosynthese und den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen zu regulieren und Apoptose-Stimuli zu widerstehen [1]. In der Arthrosepathogenese ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört. Es werden pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α ausgeschüttet, die zu dem typischen Krankheitsbild der aktiven Arthrose, charakterisiert durch Entzündung, Schmerz und dem Verlust des Knorpelgewebes, beitragen [2]. Zur Therapie der Arthrose sind in der Literatur verschiedene Ansätze beschrieben, jedoch basieren die meisten auf der Neutralisation der katabolen Wirkungen pro-inflammatorischer Zytokine [3]. Eine solche Potenz könnte das immunregulatorische Zytokin IL-10 besitzen [4]. In der Literatur gibt es erste Hinweise auf einen Antagonismus zwischen IL-10 und pro-inflammatorischen Zytokinen [5-8]. Anhaltspunkte liefern Experimente mit IL-10 an Synovialzellen und anderen Zelltypen [9]. Zusätzlich haben verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt, dass IL-10 im entzündeten Gelenk eine chondroprotektive Wirkung entfalten kann [10-13]. Seine direkten Effekte auf Chondrozyten sind jedoch noch weitgehend unklar.

ZIELSTELLUNG

Ziel des Promotionsprojektes war deshalb die genauere Charakterisierung der Wirkung des immunregulatorischen Zytokins IL-10 in Chondrozyten *in vitro*. Dabei sollte auch ein denkbarer Antagonismus zwischen IL-10 und dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α analysiert werden. Dazu wurde der Einfluß von IL-10 allein und in Co-Stimulation mit TNF- α in *in vitro* Kulturen auf die Expression knorpelspezifischer Matrixkomponenten und deren Abbau, die Expression von weiteren Zytokinen und die Chondrozytenapoptose untersucht. Neben Experimenten mit rekombinanten IL-10 wurden auch Versuche mit einem adenoviralen IL-10 Überexpressionsvektor durchgeführt, um höhere und konstantere Wirkkonzentrationen von IL-10 zu erzielen und einen möglichen gentherapeutischen Ansatz mit IL-10 im Knorpel zu simulieren.

METHODEN

CHONDROZYTENISOLIERUNG UND -KULTUR

Primäre humane Chondrozyten wurden aus nicht-arthrotischem hyalinem Gelenkknorpel (Femurkopf), der bei Gelenkersatz-Operationen (nach medialen Schenkelhalsfrakturen) abgetragen wurde, isoliert. Die Zustimmung der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Verwendung dieses Materials liegt vor (EA4/063/06). Die Knorpelzellen wurden durch enzymatischen Verdau mit 10 mg/mL Pronase (Roche Diagnostics, Mannheim) für 2 h und 2 mg/mL Kollagenase (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) über 2-4 h aus der Knorpelmatrix freigesetzt. Für die Herstellung der 3D-Alginatkulturen wurden die Chondrozyten mit einer Zellkonzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL in ein 2,5%iges Alginatgel verbracht. Für 3D-Massenkulturen wurden die Chondrozyten auf einer Celluloseacetatmembran mit $0,2 \mu\text{m}$ Porengröße (Sartorius, Göttingen) kultiviert. Als Kulturmedium diente ein Gemisch aus Dulbecco's MEM/HAM's F-12 Medium (50/50), welches mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), je 1% Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin, essentiellen Aminosäuren, Amphotericin B (alles Biochrom, Berlin), Vitamin C (Sigma, Saint Louis, USA) versetzt wurde.

STIMULATION MIT REKOMBINANTEN ZYTOKINEN

Die Chondrozyten wurden für die Versuche mit einer Zellzahl von $2,7 \cdot 10^4$ Zellen/cm² für Proteinanalysen und $5,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² für Genexpressionsanalysen in einer 6-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) über Nacht angezüchtet und vor der Stimulierung mit den rekombinanten Zytokinen für 4 h in serumreduziertem Medium (0,5% FKS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in serumreduziertem Medium mit 10 ng/mL rekombinanten humanen TNF- α (PeproTech, London, UK), 10 ng/mL rekombinanten humanen IL-10 (PeproTech, London, UK) bzw. jeweils 10 ng/mL TNF- α und IL-10 für 6, 24 und 48 h stimuliert.

ADENOVIRALE TRANSDUKTION

Die Anzucht der Chondrozyten erfolgte in 6-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden) mit einer Zellzahl von $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm². Am folgenden Tag wurden die Zellen 4 h in serumreduziertem Medium (0,5% FKS) vorinkubiert, bevor jeweils 5000 Viruspartikel/Zelle (adenoviraler humaner IL-10 Vektor [adhIL-10] bzw. Leervektor [Canji Inc., San Diego, USA]) zugegeben und 10 min bei $400 \times g$ an zentrifugiert wurden. Anschließend wurde 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, gewaschen und wieder serumreduziertem Medium zugesetzt. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen dann nach einer Ruhephase von 24 h mit rekombinantem 10 ng/mL TNF- α stimuliert.

HIL-10 ELISA

Die IL-10-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde mit einem humanen IL-10 ELISA Kit (BD OptEIA, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers gemessen.

TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Chondrozyten wurden zunächst für 30 min in Karnovsky-Lösung und anschließend in einer 1%igen OsO₄-Lösung fixiert. Die Entwässerung der Proben erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe bevor sie in Araldit (Serva, Deutschland) eingebettet wurden. Ultradünnschnitte wurden dann vor der elektronenmikroskopischen Aufnahme (EM 900, Zeiss, Deutschland) mit 2%igem Uranylacetat kontrastiert.

IMMUNZYTOCHEMIE

Für immunzytochemische Färbungen wurden entweder aus 3D-Kulturen, eingebettet in TissueTec (Sakura Finetec, Zoeterwoude, NL), Gefrierschnitte angefertigt oder die Zellen auf Glasplättchen, beschichtet mit Poly-L-Lysin, angezüchtet. Vor der Färbung wurden die Zellen 10 min mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert, anschließend 10 min mit 5% Eseserum blockiert und für intrazelluläre Färbungen zusätzlich für 6 min mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Proben 1 h mit den Primärantikörpern (anti-human Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Aggrekan, Fibronectin, β 1-Integrin, IL-10 und TNF- α) und mit FITC oder Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch oder durchflusszytometrisch am FACS-Calibur Flowzytometer mit der CellQuest Software (BD, Heidelberg, Deutschland). Die Datenauswertung der Durchflusszytometrie erfolgte unter Zuhilfenahme der FlowJo Software (Tree Star Inc., Ashland, Ore., USA).

CFDA-SE PROLIFERATIONS-ASSAY

Die Chondrozyten wurden 15 min in einer 5 μ M CFDA-SE-Lösung (Molecular Probes, Invitrogen, Ca, USA) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, danach gewaschen und für die jeweiligen Versuche entsprechend kultiviert. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten abgelöster und fixierter Zellen erfolgte durchflusszytometrisch.

PROTEINISOLIERUNG

Zur Analyse der Proteinexpression im Western-Blot oder Caspase-Assay wurden die Zellen in Lysepuffer (25 mM HEPES pH 7,5; 0,01% Triton-X-100; 5 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 1 mM EGTA) mit Proteinase-Inhibitor (Complete mini, Roche Diagnostics, Penzberg) homogenisiert und die Gesamt-Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode (Roti-Nanoquant, Roth, Karlsruhe) bestimmt.

WESTERN-BLOT

Die Proteine in den Lysaten wurden mit 10%iger Trichloressigsäure (Roth, Karlsruhe) gefällt und in reduzierendem 1x Proteinprobenpuffer (Roti-Load 1, Roth) aufgenommen. Proben mit gleichem Proteingehalt wurden über ein 10 bis 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels einer Transblot Elektrophorese Apparatur (BioRad, München) auf eine Nitrocellulose-Membran (Roth, Karlsruhe) transferiert. Nach Blockierung der Membranen mit 5% Milchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz) wurden sie über Nacht mit Antikörpern, gerichtet gegen menschliches bax und bcl-2, inkubiert und anschließend mit Avidin-HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern für 1 h inkubiert. Das Signal konnte dann durch Zugabe des ECL-Substrates (Immobilon Western HRP Substrat Luminol Reagent und Peroxidase Solution, Millipore, Schwalbach) mit einem Chemilumineszenz-Detektions-System (LAS-3000, Fujifilm, Raytest, Straubenhardt) aufgenommen werden. Die Expressionsstärke wurde densitometrisch mit der Software AlphaDigiDoc (Alpha Innotech, Kalifornien, USA) ermittelt. Als Beladungskontrolle diente das Housekeeping Protein β -Actin (Sigma, Saint Louis, USA).

CASPASE-ASSAY

In Proteinlysaten wurden die Aktivitäten der Caspasen 8 und 9 einzeln und die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 zusammen, da sehr ähnliche Substrate gespalten werden, bestimmt (Caspase-Glo 8 Assay und Caspase-Glo 9 Assay, Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7, Promega Californien). Beide Methoden wurden nach Protokoll des Herstellers durch Nachweis des Substratumsatzes durchgeführt. Die Detektion erfolgte an einem TECAN Genios Reader (Genios Instruments, Männedorf, Schweiz).

REAL-TIME-PCR

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden) mit DNase-Verdau. Die Konzentration, Reinheit und Qualität wurde mit RNA nano Chips der Firma Agilent Technologies (Walsbronn) ermittelt. Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) mit oligo-dT und random Primern verwendet. Die real-time-PCR wurde mit dem Quantitec Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden) und spezifischen Primern (Quantitec Gene Expression Assays, Qiagen, Hilden) am Opticon Monitor 1 (BioRad, München) durchgeführt. Bei allen Protokollen wurden nach Angaben des Herstellers verfahren.

STATISTIK

Die Ergebnisse der stimulierten Zellen wurden mit Bezug auf die Kontrolle normalisiert. Die Ermittlung der Signifikanzen erfolgte über den Student's t-Test (gepaart, zweiseitig) mit einer festgelegten Grenze von $p \leq 0,05$.

ERGEBNISSE

IL-10 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON KNORPELMATRIXPROTEINEN

Um den Effekt von IL-10 und TNF- α auf die Matrixproduktion zu untersuchen, wurden Chondrozyten mit rekombinatem TNF- α und rekombinatem IL-10 stimuliert bzw. mit dem adenoviralen IL-10 Überexpressionsvektor transduziert. Parallel diente ein Leervektor als Kontrolle, um die isolierten Effekte des Vektors abzugrenzen. Nach sechs und 24 Stunden wurden Genexpressionsanalysen und nach 48 Stunden immunzytochemische Färbungen angefertigt.

In dieser Arbeit wurde ein inhibitorischer Effekt von TNF- α auf die Gen- und Proteinexpression des Hauptmatrixproteins im Knorpel, Kollagen Typ II, deutlich. Im Gegensatz dazu konnte durch rekombinantes IL-10 oder durch Überexpression von IL-10 die Transkription des Kollagen Typ II Gens signifikant gesteigert werden. Immunzytochemisch war jedoch keine vermehrte Proteinexpression zu erkennen. Auch der Leervektor übte eine leicht stimulatorische Wirkung auf die Kollagen Typ II Expression aus. Die durch Genexpressionsanalysen und immunzytochemische Färbungen erhaltenen Signalstärken der Co-Stimulation ähnelten denen, die bei einer alleinigen TNF- α Stimulation beobachtet wurden. Eine modulatorische Wirkung von IL-10 auf die durch TNF- α induzierte, verminderte Expression war somit nicht nachweisbar. Anders verhielt es sich bei der Genexpression von Aggrekan: hier war keine Wirkung von IL-10 allein zu messen und auch der Leervektor nahm keinen erkennbaren Einfluss. Jedoch wurde ein eindeutiger antagonistischer Effekt deutlich, da die durch TNF- α verursachte signifikante Suppression der Aggrekan Expression durch IL-10 wieder aufgehoben werden konnte. Im Falle von hohen IL-10 Konzentrationen aufgrund der IL-10 Überexpression war dieser antagonistische Effekt sogar signifikant.

IL-10 REGULIERT DIE EXPRESSION VON MATRIXABBAUENDEN ENZYMEN

Die Daten zur Untersuchung der Genexpression von matrixabbauenden Enzymen, MMP-3 und MMP-13, sechs und 24 Stunden nach Stimulation, ließen einen deutlichen stimulatorischen Effekt von TNF- α auf deren Expression erkennen. Auch die Überexpression von IL-10 führte zu einem leichten aber signifikanten Anstieg der MMP-13 Expression. Rekombinantes IL-10 zeigte keine Effekte. Im Vergleich zu den nur mit TNF- α stimulierten Chondrozyten zeigten die Daten der Co-Stimulation mit IL-10 zeitabhängig eine verminderte MMP-3 und MMP-13 mRNA Expression. Analog dazu deuteten auch unveröffentlichte Western-Blot-Analysen zum Nachweis der MMP-13 Proteinexpression darauf hin, dass es nach Stimulation mit rekombinanten Zytokinen bzw. nach Transduktion mit dem adhIL-10-Vektor zu einer verminderten MMP-13 Synthese im Vergleich zu nur mit TNF- α stimulierten Kontrollen kommt. Auch der Leervektor zeigte suppressive Wirkungen auf die durch TNF- α induzierte MMP Genexpression.

IL-10 REDUZIERT ZYTOKINABHÄNGIG DIE TNF- α INDUZIERTE EXPRESSION ENTZÜNDLICHER ZYTOKINE

TNF- α induzierte nach sechs und 24 Stunden Stimulation die Genexpression aller untersuchten Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-10. Rekombinantes oder überexprimiertes IL-10 allein hatte nur auf die Expression von TNF- α einen leicht stimulatorischen Effekt. IL-1 β , IL-6 und IL-10 wurden durch IL-10 nicht reguliert. Die von TNF- α induzierte IL-1 β Expression konnte durch rekombinantes und überexprimiertes IL-10 nach sechs bzw. 24 Stunden abgesenkt werden. Die TNF- α vermittelte Expression von TNF- α und IL-6 wurde durch eine IL-10 Überexpression, aber nicht durch rekombinantes IL-10 inhibitorisch beeinflusst. Allerdings zeigte auch der Leervektor ähnliche Effekte wie der IL-10 Überexpressionsvektor, indem er die durch TNF- α induzierte TNF- α und IL-6 Genexpression reduzierte.

IL-10 MODULIERT PRO-APOPTOTISCHE EFFEKTE VON TNF- α

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-10 in Chondrozyten auf die Apoptoseinduktion durch TNF- α und um zu unterscheiden, ob durch IL-10 der intrinsische oder der extrinsische Apoptoseweg beeinflusst wird, wurde die Aktivität der Initiatorcaspasen 8 und 9 und der Effektorcaspasen 3 und 7 ermittelt. Außerdem wurde die Expression des pro-apoptotischen Proteins bax und des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 und deren für die Weiterleitung des Signals und Aktivierung der Caspase 9 wichtiges Verhältnis zueinander untersucht (bax/bcl-2 Ratio). Die Chondrozyten wurden für 48 Stunden mit rekombinanten TNF- α , IL-10 oder mit einer Kombination beider Zytokine behandelt. TNF- α erhöhte die Aktivität aller untersuchten Caspasen. und eine Analyse auf Proteinebene im Western-Blot bestätigte eine signifikant erhöhte bax/bcl-2 Ratio. Durch die Co-Stimulation mit IL-10 wurden die Aktivitäten aller Caspasen wieder tendenziell erniedrigt und die bax/bcl-2 Ratio ging unter Co-Stimulation im Vergleich zu nur mit TNF- α stimulierten Zellen sogar signifikant zurück.

IL-10 ÜBEREXPRESSIONSDAUER UND HOMÖOSTASE VON CHONDROZYTEN

In dem Projekt wurde die Verwendbarkeit eines adenoviralen IL-10 Überexpressionsvektors näher analysiert. 48 h nach Transduktion mit dem adenoviralen IL-10 Überexpressionsvektor und dem Leervektor waren keine Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene in den transduzierten Chondrozyten im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar. Die Expressionsdauer des Transgens und der Effekt der Transduktion und Überexpression auf den differenzierten Phänotyp der Chondrozyten wurden in zwei verschiedenen 3D-Kulturmodellen, Alginat- und Massenkulturen, untersucht. Als Marker wurden die Hauptmatrixproteine im Knorpel Kollagen Typ II und Aggrecan gewählt. Außerdem wurde als Zeichen für eine Dedifferenzierung oder einen veränderten Phänotyp

die Genexpression von Kollagen Typ I, die Synthese des Glykoproteins Fibronectin und β 1-Integrin, einem Zelloberflächenrezeptor, welche unter anderem die wichtige Signalweiterleitung zwischen Zelle und Matrix vermitteln [14-16], untersucht.

ELISA Daten zeigten, dass im Alginat kultivierte Chondrozyten 48 Stunden nach Transduktion sehr große Mengen an IL-10 in das Zellkulturmedium abgaben. Die Konzentration nahm zwar im Laufe der Kultivierung stetig ab, war jedoch nach 14 Tagen immer noch deutlich detektierbar. Noch unveröffentlichte Daten zeigten im Vergleich dazu aber eine schnellere Abnahme der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand, wenn die Chondrozyten im Monolayer kultiviert wurden. Adenovirale Vektoren führen nur zu einer transienten Expression des Transgens, da dieses nicht in das Wirtsgenom eingebaut wird und so durch Zellteilung verloren geht [17]. Der Vergleich der Zellteilungsrate in Proliferationsassays zeigte übereinstimmend dazu auch eine weitaus schnellere Teilungsrate von Zellen im Monolayer im Vergleich zu Zellen, die in einer 3D-Alginatkultur kultiviert wurden. Trotz der Sekretion dieser großen Mengen an IL-10 wurde hier die Expressionsstärke von Kollagen Typ II nicht beeinflusst. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Chondrozyten, die in Massenkulturen kultiviert wurden. Auch hier exprimierten die Zellen nach der Transduktion mit dem Virus und der daraus resultierenden Überexpression weiterhin ähnliche Mengen an Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ I wie Vergleichszellen. Auch Fibronectin und β 1-Integrin wurden durch die Infektion mit dem Virus nicht beeinflusst.

DISKUSSION

In der Arthrosepathogenese werden durch TNF- α viele katabole Prozesse induziert, die letztendlich zu dem charakteristischen Knorpelmatrixverlust führen. In Tiermodellen zur rheumatischen Arthritis wirkte IL-10 chondroprotektiv, indem es Entzündungsreaktionen und den Knorpelmatrixverlust verminderte [10-13]. Trotzdem ist über die Wirkung des immunregulatorischen Zytokins IL-10 und seine Wechselwirkung mit pro-inflammatorischen Zytokinen im Knorpel bisher wenig bekannt. Diese Arbeit sollte daher die Beeinflussung der durch TNF- α induzierten katabolen Effekte im Bereich des Matrixaufbaus und -abbaus, der Inflammation und der Apoptose durch IL-10 näher analysieren.

Ein inhibitorischer Effekt von TNF- α auf die Expression der wichtigen Knorpelkomponenten Kollagen Typ II und Aggrekan ist bekannt [18, 19] und konnte auch in diesen Untersuchungen bestätigt werden. In anderen Zelltypen wurde auch schon ein direkter Einfluss von IL-10 auf die Expression von Matrixproteinen nachgewiesen [20]. Analog dazu stimulierte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit IL-10 signifikant die Genexpression von Kollagen Typ II. Ein antagonistischer

Effekt von IL-10 wurde an der durch TNF- α verminderten Genexpression von Aggrecan deutlich. Neben der verminderten Matrixexpression induzierte TNF- α gleichzeitig eine vermehrte Synthese von matrixabbauenden Enzymen, den MMPs, die in der Lage sind, Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix gezielt abzubauen und somit für die Zerstörung des Knorpels maßgeblich verantwortlich sind [21, 22]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten auf mRNA- und Proteinebene nachweisen, dass TNF- α die Expression von MMPs induziert [21, 23]. Weiterhin wurde von Wang and Lou [24] bereits eine Hemmung der MMP-3 mRNA Expression in Chondrozyten durch IL-10 gezeigt. Diese Eigenschaft von TNF- α und IL-10 konnte in diesem Projekt tendenziell auch beobachtet werden. TNF- α induzierte die Genexpression von MMP-3 und MMP-13, während IL-10 in Co-Stimulation diese Effekte teilweise zu antagonisieren vermochte. Eine klare Aussage über die Effekte von TNF- α und IL-10 war jedoch aufgrund der hohen Spendervariabilität, die bei der Arbeit mit menschlichem Knorpelmaterial nicht ungewöhnlich ist, nur unter Vorbehalt möglich. Diese spenderabhängige Varianz in der Reaktionsstärke von Chondrozyten auf pro-inflammatorische Zytokine wurden auch von Fan et al. beobachtet [25].

TNF- α induziert neben dem aktiven Matrixverlust auch die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder IL-6, die die katabolen Mechanismen zusätzlich verstärken. IL-10 konnte in diesen Versuchen erfolgreich die vermehrte Inflammation durch TNF- α beeinflussen. Einige Autoren postulieren, dass genau darin die protektive Wirkung von IL-10 begründet liegt, indem es die Expression entzündlicher Zytokine hemmt [26-28]. Welche Regulationsmechanismen dabei wirken, ist allerdings noch weitgehend unklar. So wurde in Studien mit Makrophagen beschrieben, dass es durch IL-10 zur Regulation der TNF- α Expression oder zur vermehrten Freisetzung von löslichem TNF-Rezeptoren kommt und IL-10 seine protektiven Eigenschaften vor allem über seinen Transkriptionsfaktor STAT-3 entfaltet [28]. Auch könnte die Hemmung von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, über den TNF- α wichtige pro-inflammatorische Wirkungen steuert [29], ein Grund sein [30, 31].

Ein weiterer wichtiger kataboler Prozess während der Arthrosepathogenese ist der zunehmende Verlust vitaler Chondrozyten im Knorpel. Für TNF- α ist bekannt, dass es über den TNF-Rezeptor I Apoptose in den Chondrozyten auslösen kann [32-34] und für IL-10 wurde die Regulation von Apoptosesignalen schon in anderen Zelltypen beobachtet [8, 19, 35]. Außerdem zeigten Wang und Lou [24] einen direkten protektiven Effekt von IL-10 auf den durch IL-1 β induzierten Zelltod von Chondrozyten. Die ermittelten Daten zur Apoptose in Chondrozyten deuten aufgrund der erhöhten Caspase 3 und 7 Aktivität [36, 37] an, dass es zunächst möglich ist, *in vitro* Apoptose in Chondrozyten durch TNF- α auszulösen. Nicht veröffentlichte Daten zur Untersuchung der tatsächlich stattfindenden Apoptose mit Hilfe des TUNEL Assays, in dem charakteristische DNA-

Strangbrüche detektiert werden können, bestätigen die Ergebnisse, die mit rekombinanten Zytokinen erzielt wurden. Die Caspaseaktivitäten und die Expression der mitochondrialen Apoptosefaktoren lassen vermuten, dass die Apoptose durch TNF- α unter Serumentzug zwar auch über den rezeptorvermittelten, aber wahrscheinlich hauptsächlich über den intrinsischen Apoptoseweg in den Chondrozytenkulturen induziert wird. Lopez-Armada et al. [38] konnten bestätigend dazu nachweisen, dass es durch TNF- α zu einer Änderung des Membranpotentials der Mitochondrien kommt, welches die intrinsische Apoptose begünstigt. Ebenso wurde deutlich, dass IL-10 die Potenz besitzt, in einem gewissen Maße die Apoptoseinduktion durch die Verminderung der Aktivitäten der Caspasen sowie eines günstigeren bax/bcl-2 Verhältnisses für die Zellen, zu hemmen.

Um die chondroprotektiven Eigenschaften von IL-10 therapeutisch nutzen zu können, stellte sich die Frage, wie dieses Zytokin in ausreichender Menge an seinen Wirkungsort gebracht werden kann. Des Weiteren hat rekombinantes IL-10 eine relativ geringe Halbwertszeit. Dadurch notwendige, wiederholte Injektionen von IL-10 in das Gelenk verbieten sich aufgrund erhöhter Infektionsgefahren. Daher wurde nicht nur die Wirkung von IL-10 mit rekombinanten Zytokinen evaluiert, sondern auch ein adenoviraler Überexpressionsvektor eingesetzt. In einer früheren Veröffentlichung wurde schon bestätigt, dass sich primäre humane Chondrozyten mit einem adenoviralen EGFP-Überexpressionsvektor erfolgreich transduzieren lassen und dabei abhängig von der Viruskonzentration eine Transduktionsrate von bis zu 47% erzielen lassen [42]. In den Versuchen dieser Promotionsarbeit wurden die Chondrozyten in einer 3D-Kultur kultiviert, da diese Umgebung besser die *in vivo* Bedingungen der Zellen simuliert [43]: Sie behalten über einen längeren Zeitraum ihren differenzierten Zustand und können so länger kultiviert werden als in Monolayerkulturen [44, 45]. Morphologische Zellveränderungen aufgrund der Transduktion mit dem Überexpressionsvektor, die zu einer Beeinträchtigung der Zellen führen könnten, konnten durch Anfertigung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen ausgeschlossen werden. Auch wurde durch Analysen der Syntheseleistung von Matrixproteinen und morphologische Betrachtungen bestätigt, dass dieses Modell den differenzierten Phänotyp der Zellen nicht folgenreich beeinflusst. Jedoch hatte auch der Leervektor einige modulatorische Effekte auf die von TNF- α induzierte Expression von MMPs oder Zytokinen. Die stimulierende Wirkung der Transduktion mit einem adenoviralen Vektor auf die endogene IL-10 Expression könnte diesen Effekt jedoch erklären [46]. Die mit dem adenoviralen IL-10 Überexpressionsvektor transduzierten Zellen waren in der Lage, über mindestens zwei Wochen hohe Mengen an IL-10 in das Zellkulturmedium abzugeben. In den Versuchen wurde auch deutlich, dass die Stärke des Effektes von IL-10 oft abhängig von der vorliegenden IL-10 Konzentration war. Einige durch das

rekombinante IL-10 induzierte Effekte traten bei einer IL-10 Überexpression und damit höheren lokalen Wirkkonzentration von IL-10 deutlicher hervor. Eine gentechnische Veränderung der Chondrozyten, z.B. mit Hilfe von Viren als Vektoren, so dass die Zellen das Zytokin vor Ort selbst synthetisieren, scheint also sinnvoll. Eine Applikation von viralen Vektoren in die Gelenkhöhle führt nicht zwingend zu einer Transduktion der Zielzellen, den Chondrozyten, da diese von einer für die meisten Vektoren undurchdringlichen Matrix umgeben sind [39, 40]. Nur sehr hohe Virusdosen würden einen gewünschten Effekt herbeiführen. Aufgrund einer erhöhten Gefahr von Abwehrreaktionen des Körpers ist dies jedoch keine Option. Daher ist es nötig *ex vivo* Strategien zu entwickeln, um die Chondrozyten effektiv so zu verändern, dass sie nach Reimplantation in den Defekt, das Transgen in hohen Mengen exprimieren. Im Rahmen einer autologen Chondrozyten Implantation (ACI) wäre eine solche Veränderung der Zellen möglich, um der Entwicklung posttraumatischer Arthrosen vorzubeugen. Auch wäre hierbei eine Kombination mit Wachstumsfaktoren oder anderen Zytokinen denkbar, die sich in Studien bisher positiv auf Knorpelwachstum und -heilung ausgewirkt haben [41].

Die Ergebnisse zeigten, dass IL-10 eine chondroprotektive Wirkung besitzt, die den Verlauf der Arthrosepathogenese verändern könnte. Viele wichtige durch TNF- α induzierte katabole Prozesse konnten durch IL-10 beeinflusst werden. IL-10 könnte damit für therapeutische Anwendungen in der Arthrose Bedeutung haben. Auch scheint hinsichtlich der Chondrozytenhomöostase die Anwendung des viralen Überexpressionssystems möglich zu sein. Die generierten Daten stammen jedoch alle aus *in vitro* Studien mit Chondrozytenkulturen. Die komplexen Mechanismen, die in einem Organismus ablaufen, lassen sich in *in vitro* Versuchen noch nicht nachstellen. Für eine klinische Translation sind daher noch umfangreiche *in vivo* Studien in einem geeigneten Tiermodell nötig, um auch hier die Wirkung von IL-10 zu bestätigen und die durch den Vektor induzierten Abwehr- und Entzündungsreaktionen zu evaluieren.

ABKÜRZUNGEN

bax	<u>B</u> CL-2 <u>A</u> ssociated <u>X</u> protein
bcl-2	<u>B</u> <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma- <u>2</u>
CFDA-SE	<u>C</u> arboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> roteins
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
FKS	fötales <u>K</u> älberserum
IL	<u>I</u> nterleukin
MMP	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase
NF κ B	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>κ</u> <u>B</u>
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
STAT-3	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription- <u>3</u>
TNF- α	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> aktor- <u>α</u>
TUNEL	<u>T</u> erminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Deoxyuridine Triphosphate <u>N</u> ick- <u>E</u> nd <u>L</u> abeling

LITERATUR

1. Haqqi, T.M., Anthony, D.D., Malesud, C.J., Chondrocytes. Principles of Molecular Rheumatology. GC Tsokos, Editor, Humana Press, Totowa., 2000: p. 267-77.
2. Chikanza, I. and L. Fernandes, Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. Expert Opin Investig Drugs, 2000. 9(7): p. 1499-510.
3. Malesud, C.J., N. Islam, and T.M. Haqqi, Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. Cells Tissues Organs, 2003. 174(1-2): p. 34-48.
4. Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier, The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology, 2002. 39(1-2): p. 237-46.
5. Dayer, J.M., [Cytokines and anti-cytokines in inflammatory rheumatism]. Rev Rhum Ed Fr, 1994. 61(10 Pt 2): p. 173S-180S.
6. Iannone, F., et al., Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. Clin Exp Rheumatol, 2001. 19(2): p. 139-45.
7. Katsikis, P.D., et al., Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. J Exp Med, 1994. 179(5): p. 1517-27.
8. Rojas, M., et al., TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. J Immunol, 1999. 162(10): p. 6122-31.
9. Moo, V., et al., Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. Clin Rheumatol, 2001. 20(5): p. 353-8.
10. Jorgensen, C., et al., Systemic viral interleukin-10 gene delivery prevents cartilage invasion by human rheumatoid synovial tissue engrafted in SCID mice. Arthritis Rheum, 1999. 42(4): p. 678-85.

11. Lechman, E.R., et al., Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol*, 1999. 163(4): p. 2202-8.
12. Lechman, E.R., et al., The contralateral effect conferred by intra-articular adenovirus-mediated gene transfer of viral IL-10 is specific to the immunizing antigen. *Gene Ther*, 2003. 10(24): p. 2029-35.
13. Neumann, E., et al., Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther*, 2002. 9(22): p. 1508-19.
14. Cao, L., et al., beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol*, 1999. 18(4): p. 343-55.
15. Hirsch, M.S., et al., Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn*, 1997. 210(3): p. 249-63.
16. Homandberg, G.A., Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front Biosci*, 1999. 4: p. D713-30.
17. Zhang, X. and W.T. Godbey, Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(4): p. 515-34.
18. Seguin, C.A. and S.M. Bernier, TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Physiol*, 2003. 197(3): p. 356-69.
19. Zhou, J.H., et al., IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol*, 2001. 167(8): p. 4436-42.
20. Yamamoto, T., B. Eckes, and T. Krieg, Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 281(1): p. 200-5.
21. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 529-43.
22. Cho, T.J., et al., Tumor necrosis factor alpha activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(10): p. 2845-54.
23. Liacini, A., et al., Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 2003. 288(1): p. 208-17.
24. Wang, Y. and S. Lou, Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. *Chin Med J (Engl)*, 2001. 114(7): p. 723-5.
25. Fan, Z., et al., Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(1): p. 136-43.
26. Antoniv, T.T. and L.B. Ivashkiv, Dysregulation of interleukin-10-dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(9): p. 2711-21.
27. Qing, M., et al., Intrahepatic synthesis of tumor necrosis factor-alpha related to cardiac surgery is inhibited by interleukin-10 via the Janus kinase (Jak)/signal transducers and activator of transcription (STAT) pathway. *Crit Care Med*, 2003. 31(12): p. 2769-75.
28. Williams, L., et al., Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 567-76.
29. Renard, P. and M. Raes, The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies. *Cell Biol Toxicol*, 1999. 15(6): p. 341-4.
30. Schottelius, A.J., et al., Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, 1999. 274(45): p. 31868-74.
31. Wang, P., et al., Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*, 1995. 270(16): p. 9558-63.

32. Aigner, T. and H.A. Kim, Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(8): p. 1986-96.
33. Aizawa, T., et al., Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res*, 2001. 19(5): p. 785-96.
34. Fischer, B.A., S. Mundle, and A.A. Cole, Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis. *Microsc Res Tech*, 2000. 50(3): p. 236-42.
35. Bouton, L.A., et al., Costimulation with interleukin-4 and interleukin-10 induces mast cell apoptosis and cell-cycle arrest: the role of p53 and the mitochondrion. *Exp Hematol*, 2004. 32(12): p. 1137-45.
36. Cohen, G.M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997. 326 (Pt 1): p. 1-16.
37. Kim, H.A., et al., Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol*, 2000. 27(2): p. 455-62.
38. Lopez-Armada, M.J., et al., Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(10): p. 1011-22.
39. Ikeda, T., et al., Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol*, 2000. 27(4): p. 990-6.
40. Madry, H., et al., Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther*, 2005. 12(15): p. 1171-9.
41. Hickey, D.G., S.R. Frenkel, and P.E. Di Cesare, Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop*, 2003. 32(2): p. 70-6.
42. Oberholzer, A., et al., Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 2007. 328(2): p. 383-90.
43. Müller, R.D., et al., IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF α . *Cytokine*, 2008. in press.
44. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*, 2005. 23(2): p. 425-32.
45. Schnabel, M., et al., Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(1): p. 62-70.
46. Oberholzer, C., et al., In vivo transduction of thymic dendritic cells with adenovirus and its potential use in acute inflammatory diseases. *Scand J Immunol*, 2005. 61(4): p. 309-15.

ANTEILSERKLÄRUNG

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

PUBLIKATION 1

John T, **Müller RD**, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, Hostmann A, Tschöcke SK, Schulze-Tanzil G. Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- α in human articular chondrocytes *in vitro*. *Cytokine* 2007; 40: 226-234.

ANTEIL: 40%

BEITRAG IM EINZELNEN: Isolierung und Kultur der Chondrozyten, Etablierung der real-time-PCR, gesamte Planung und Durchführung der folgenden Analysemethoden: Caspase-Aktivitäts-Assays, Western-Blot-Analysen und real-time-PCR, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse.

PUBLIKATION 2

Müller RD, John T, Kohl B, Feldner A, Zreiqat H, Ertel W, LaFace D, Hutchins B, Oberholzer A, Schulze-Tanzil G. Cartilage-specific matrix and integrin expression in three-dimensional articular chondrocyte cultures overexpressing human interleukin-10. *Clin Med Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 2008; 1: 21-32.

ANTEIL: 60%

BEITRAG IM EINZELNEN: Isolierung und Kultur der Chondrozyten, vollständige Planung und Durchführung der folgenden Methoden: 3D-Kulturen, Durchflusszytometrie, adenovirale Transduktion, hIL-10 ELISA, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript.

PUBLIKATION 3

Müller RD, John T, Oberholzer A, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, Hellmuth M, LaFace D, Hutchins B, Laube G, Veh RW, Tschoeke SK, Ertel W, Schulze-Tanzil G. IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- α . *Cytokine* 2008; 44: 377-85.

ANTEIL: 40 %

BEITRAG IM EINZELNEN: Isolierung und Kultur der Chondrozyten, Versuchsplanung, Mitarbeit an den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, vollständige Planung und Durchführung folgender Methoden: adenovirale Transduktion und real-time-PCR, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript.

Prof. Dr. W. Ertel
(Doktorvater)

Riccarda Müller
(Promovendin)

AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

PUBLIKATION 1

John T, Müller RD, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, Hostmann A, Tschöcke SK, Schulze-Tanzil G.

Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- α in human articular chondrocytes *in vitro*.

Cytokine 2007; 40: 226-234. Impact Factor: 2,2

ABSTRACT

The aim of this study is to determine if there is an antagonistic effect between tumour necrosis factor (TNF)-alpha and the immunoregulatory interleukin (IL)-10 on chondrocytes survival. Serum-starved primary human articular chondrocytes were stimulated with either 10 ng/ml recombinant TNF-alpha, IL-10 or a combination of both (at 10 ng/ml each). Chondrocyte apoptosis was determined by measuring caspase-3/7, -8 and -9 activities using caspase assays. Mitochondrial apoptotic inducer bax, and the suppressor bcl-2 were evaluated using western blotting at 48 h. Results indicated that TNF-alpha increased caspase activities and resulted in a significant ($p = 0.001$) increase in bax/bcl-2 ratio. Stimulation with IL-10 did not alter caspase activities, while co-treatment with IL-10 and TNF-alpha inhibited TNF-alpha induced caspase activities and significantly ($p > 0.004$) impaired bax/bcl-2 ratio. At 24 h, mRNA levels for collagen type II, TNF-alpha and IL-10 were determined using real-time RT-PCR. Stimulation with TNF-alpha or TNF-alpha and IL-10 significantly inhibited collagen type II and increased IL-10 and TNF-alpha mRNA expression. IL-10 modulated the pro-apoptotic capacity of TNF-alpha in chondrocytes as shown by the decrease in caspase activities and bax/bcl-2 ratio compared to TNF-alpha stimulated chondrocytes, suggesting a mostly antagonistic interplay of IL-10 and TNF-alpha on mitochondrial apoptotic pathways.

PUBLIKATION 2

Müller RD, John T, Kohl B, Feldner A, Zreiqat H, Ertel W, LaFace D, Hutchins B, Oberholzer A, Schulze-Tanzil G.

Cartilage-specific matrix and integrin expression in three-dimensional articular chondrocyte cultures overexpressing human interleukin-10.

Clinical Medicine: Arthritis and Musculoskeletal Disorders 2008; 1: 21-32.

Noch kein Impact Factor verfügbar.

ABSTRACT

Interleukin (IL)-10 overexpression inhibits joint inflammation, however the effect of high local concentrations of IL-10 on chondrocyte homeostasis remains unclear. The aim of this study was to determine the effects of IL-10 overexpression on cartilage matrix production in three-dimensional (3D) chondrocyte cultures. Human articular chondrocytes were transduced with adenoviral vectors alone (adv/empty) or by vectors either overexpressing enhanced green fluorescence protein (adv/EGFP) or human IL-10 (adv/hIL-10) before their transfer to a 3D culture system. Non-transduced chondrocytes were used as controls. The expression of IL-10 or EGFP was confirmed using ELISA or flow cytometry. Chondrocytes synthesis of collagen types II and I, aggrecan, fibronectin and β 1-integrin was determined over a period of 14 days post transduction using flow cytometry or immunohistochemistry. adv/EGFP or adv/IL-10 transduced chondrocytes expressed EGFP or secreted IL-10 detectable over the 2 weeks culture period. No suppression of collagen type II, aggrecan or β 1-integrin synthesis by IL-10 overexpression was found and the deposition of collagen type I and fibronectin remained unaffected compared to the controls. IL-10 overexpression does not impair key features of chondrocytes differentiated phenotype (e.g. collagen type II and aggrecan expression) suggesting the potential use of IL-10 for gene therapeutic approaches in the joint.

PUBLIKATION 3

Müller RD, John T, Oberholzer A, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, Hellmuth M, LaFace D, Hutchins B, Laube G, Veh RW, Tschoeke SK, Ertel W, Schulze-Tanzil G.

IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- α .

Cytokine 2008; 44: 377-85. Impact Factor: 2,2.

ABSTRACT

Cartilage-specific extracellular matrix synthesis is the prerequisite for chondrocyte survival and cartilage function, but is affected by the pro-inflammatory cytokine TNF- α in arthritis. The aim of the present study was to characterize whether the immunoregulatory cytokine IL-10 might modulate cartilage matrix and cytokine expression in response to TNF- α . Primary human articular chondrocytes were treated with either recombinant IL-10, TNF- α or a combination of both (at 10ng/mL each) or transduced with an adenoviral vector overexpressing human IL-10 and subsequently stimulated with 10ng/ml TNF- α for 6 or 24h. The effects of IL-10 on the cartilage-specific matrix proteins collagen type II, aggrecan, matrix-metalloproteinases (MMP)-3, -13 and pro-inflammatory cytokines were evaluated by real-time RT-PCR and immunohistochemistry. Transduced chondrocytes overexpressed high levels of IL-10 which significantly up-regulated collagen type II expression. TNF- α suppressed collagen type II and aggrecan, but increased MMP and cytokine expression in chondrocytes compared to the non-stimulated controls. The TNF- α mediated down-regulation of aggrecan expression was significantly antagonized by IL-10 overexpression, whereas the suppression of collagen type II was barely affected. The MMP-13 and IL-1 β expression by TNF- α was slightly reduced by IL-10. These results suggest that IL-10 overexpression modulates some catabolic features of TNF- α in chondrocytes.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

ORIGINALARBEITEN

1. Giese C, Demmler CD, Ammer R, Hartmann S, Lubitz A, Miller L, **Müller R**, Marx U. A human lymph node *in vitro*-challenges and progress. *Artif Organs* 2006; 30: 803-8.
2. Oberholzer A, John T, Kohl B, Gust T, **Müller RD**, La Face D, Hutchins B, Zreiqat H, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2007; 328: 383-390.
3. John T, **Müller RD**, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, Hostmann A, Tschoeke SK, Schulze-Tanzil G. Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- α in human articular chondrocytes *in vitro*. *Cytokine* 2007; 40: 226-234.
4. **Müller RD**, John T, Kohl B, Feldner A, Zreiqat H, Ertel W, LaFace D, Hutchins B, Oberholzer A, Schulze-Tanzil G. Cartilage-specific matrix and integrin expression in three-dimensional articular chondrocyte cultures overexpressing human interleukin-10. *Clin Med Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 2008; 1: 21-32.
5. **Müller RD**, John T, Oberholzer A, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, Hellmuth M, LaFace D, Hutchins B, Laube G, Veh RW, Tschoeke SK, Ertel W, Schulze-Tanzil G. IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- α . *Cytokine* 2008; 44: 377-85.
6. Schulze-Tanzil G, Kohl B, **Müller RD**, Schneider N, Ertel W, Stark R, Ipaktchi K, John T. Differing *in vitro* biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: An immunomorphological study. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131: 219-29.
7. Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, **Müller RD**, John T. Interleukin-10 and Articular Cartilage: Experimental Therapeutical Approaches in Cartilage Disorders. *Curr Gene Ther.* 2009; [Epub ahead of print].

KONGRESSBEITRÄGE

1. Schulze-Tanzil G, Oberholzer A, **Müller RD**, Kohl B, Moldawer LL, LaFace D, Hutchins B, Ertel W, John T. Adenoviral overexpression of human IL-10 in human articular chondrocytes *in vitro*: Effect on cartilage-specific matrix and key signalling proteins. 101. *Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg* 7. - 10.04 2006, *Poster*
2. Schulze-Tanzil G, Oberholzer A, Kohl B, Gust T, **Müller RD**, La Face D, Hutchins B, Ertel W, John T. Adenoviral transduction of alginate derived chondrocytes is more efficient than using primary monolayer chondrocytes. 23. *Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg* 26.8.2006, *Vortrag*
3. **Müller RD**, John T, Oberholzer A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- α in human articular chondrocytes. 23. *Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg* 27. - 29.09.2006, *Poster*

4. **Müller RD**, John T, Oberholzer A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Modulation of TNF- α induced intrinsic apoptotic pathways in chondrocytes by IL-10. *102. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Giessen 30.3 - 2.4.2007, Vortrag*
5. **Müller RD**, John T, Oberholzer A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Interleukin-10 moduliert pro-apoptotische Wirkungen von TNF- α in menschlichen Chondrozyten. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU), Berlin 24. - 27.10.2007, Poster+Vortrag*
6. Schulze-Tanzil G, **Müller RD**, Kohl B, Oberholzer A, La Face D, Hutchins B, Ertel W, John T. Cell surface receptor expression for adenoviral cell entry is modulated by culture conditions in human articular chondrocytes. *World Congress of Regenerative Medicine, Leipzig 18. - 20.10.2007, Poster*
7. Schulze-Tanzil G, Jammrath J, John T, **Müller RD**, Kohl B, Ertel W. Th2-cytokines modulate the expression of cell matrix receptors and Kollagen type I in tenocytes *in vitro*. *11. Chirurgische Forschungstage, Saarbrücken 15 - 17.11.2007, Poster*
8. **Müller RD**, John T, Kohl B, Feldner A, Schulze-Tanzil G. Effects of interleukin-10 overexpressing in two- and three-dimensional chondrocytes cultures. *103. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Innsbruck 14.3 - 17.3.2008. Vortrag*
9. **Müller RD**, John T, Kohl B, Feldner A, Ertel W, Oberholzer A, Schulze-Tanzil G. Interleukin-10 Überexpression in Chondrozytenkulturen. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU), Berlin 22. - 25.10.2008, Vortrag*
10. Schulze-Tanzil G, **Müller RD**, Kohl B, Ertel W, John T. Speziesunterschiede bei Kniegelenk-Knorpelzellen vom Großtier und Menschen *in vitro* als Ausblick auf Tiermodelle in der Knorpelforschung. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU), Berlin 22. - 25.10.2008, Vortrag*
11. Schulze-Tanzil G, Kohl B, **Müller RD**, El-Sayed K, Ertel W, John T. Extracellular matrix synthesis in large animal- and human derived articular chondrocytes: implications for cartilage tissue engineering. *Bone-Tec, Hannover 7 - 9.11.2008, Vortrag*

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Riccarda Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Effekte einer Interleukin-10 Überexpression in humanen Gelenkchondrozyten
und Interaktion von Interleukin-10 mit Tumor Nekrose Faktor- α

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle recht herzlich bei all jenen bedanken, die mir während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und damit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Meinem Doktorvater PROF. DR. WOLFGANG ERTEL möchte ich für die Betreuung danken und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt DR. GUNDULA SCHULZE-TANZIL, die mich während der letzten Jahre liebevoll betreut hat. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz, ihre Unterstützung und Motivation wäre diese Arbeit wohl nie zustande gekommen. Ich habe in den letzten Jahren viel von ihr lernen dürfen.

Herzlichst gedankt sei auch DR. THILO JOHN, der über die Jahre immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Besondere Erwähnung sollen hier zwei der besten TA's der Welt finden!

Allen voran BENJAMIN KOHL - es war mir eine außerordentliche Freude mit ihm zu arbeiten. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit ihm neue Ideen und Pläne auszudeckeln und das ganze Labor auf den Kopf zu stellen. Es sei hier auch MARKUS WIETSTRUK gedankt, der mir, obwohl er nicht zu unserer Arbeitsgruppe gehörte, bei der Lösung von vielen methodischen Problemen immer mit Rat, Tat und seinem Chemieschrank zur Seite stand.

Dank gilt auch ALLEN ANDEREN die hier nicht namentlich erwähnt werden können.

Meinen Kollegen, Mitdoktoranden, Diplomanden und Praktikanten der Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima, etliche Diskussionen, problemlose Hilfe bei verschiedensten Labortätigkeiten und viele sonstige Kleinigkeiten. Danke auch allen Korrekturlesern dieser Arbeit für eure Adleraugen.

Ein Dankeschön an MEINE FAMILIE für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen. Vor allem MEINER SCHWESTER NAVINA möchte ich danken, die mir die schönsten Diagramme, Poster und Präsentationen gestaltet hat. Von Herzen sei auch JAN ALTROCK gedankt, für die unermüdliche Motivation und vieles vieles mehr.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich die Organisationen die dieses Projekt durch Ihre finanzielle Unterstützung ermöglicht haben. Die DEUTSCHE ARTHROSEHILFE für die Bereitstellung der Sachmittel und das HYPATIA-PROGRAMM DER TECHNISCHEN FACHHOCHSCHULE BERLIN für das Promotionsstipendium - hier möchte ich besonders PROF. DR. MONIKA GROSS für ihre Betreuung danken.