

Aus dem Charité Centrum 2 für Grundlagenmedizin  
Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Nitsch

## Habilitationsschrift

### **Inflammation und Dedifferenzierung von Gelenkknorpelzellen**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil  
geboren am 25.10.1970 in Berlin

eingereicht: 27.10.2008

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter 1. Prof. Dr. Friedrich Paulsen

2. Prof. Dr. Magdalena Müller-Gerbl

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Das Gelenk und der Gelenkknorpel	4
1.2	Gelenkknorpelverletzungen, Knorpelzelltransplantationen, sekundäre Arthrose	8
1.3	Interleukin-10	12
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse: Zusammenfassung der eigenen Arbeiten</b>	<b>17</b>
3.1	Dedifferenzierung und Redifferenzierungspotential von Chondrozyten	17
3.2	Integrine kooperieren mit Zelloberflächenrezeptoren und katabolen Mediatoren	19
3.3	Hemmung kataboler Effekte pro-inflammatorischer Zytokine durch Phytopharmaka in Chondrozyten	20
3.4	Wirkung von Interleukin-10 in Knorpelzellen	22
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>25</b>
4.1	Dedifferenzierung von Chondrozyten	25
4.2	$\beta$ 1-Integrinrezeptoren in Chondrozyten	26
4.3	Beeinflussung Zytokin-induzierter Effekte durch Phytopharmaka	27
4.4	Wirkungen von Interleukin-10 auf Knorpelzellen	28
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>44</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
ACI	Autologe Chondrozyten Implantation
COX-2	Cyclo Oxygenase-2
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK1/2	Extracellular signal Regulated Kinase 1/2
ICAM-I	Intercellular Adhesion Molecule-I
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxid Synthetase
kDa	kilo Dalton
MACI	Matrix Assistierte Chondrozyten Implantation
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMP	Matrix MetalloProteinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
OA	Osteoarthritis
PBS	Phosphate Buffered Saline
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SHC	src Homology Collagen
SOCS-3	Suppressor Of Cytokine Signalling-3
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
uPAR	urokinase Plasminogen Activator Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gelenk und der Gelenkknorpel

Die Gelenke sind die spezifischen Einrichtungen, die die Beweglichkeit und Flexibilität des gesamten muskuloskeletalen Bewegungsapparates ermöglichen. Das Gelenk stellt nicht nur ein durch die Gelenkkapsel und -haut umschlossenes Kompartiment dar, sondern seine Bauelemente bilden eine dynamische Funktionseinheit. In dieser wird die Synovia, produziert von der Membrana synovialis, bei der Entlastung des Gelenkes im hyalinen Gelenkknorpel aufgenommen und durch Proteoglykane der extrazellulären Knorpelmatrix reversibel gebunden, um bei Druck-Belastung wieder freigesetzt zu werden. Dadurch wird zusätzlich zum Nährstoffaustausch im Gelenkknorpel ein Informationsfluß von unzähligen bekannten und noch unbekanntem Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren von der Synovialmembran bis in den subchondralen Knochen hinein ermöglicht - als wichtige Voraussetzung für den Erhalt der Homöostase im gesunden Gelenk.

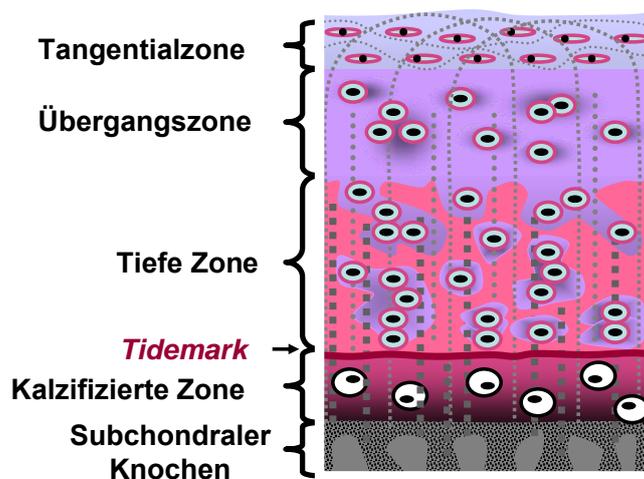
Der hyaline Gelenkknorpel, der ohne eine eigene Blutversorgung auskommen muß, wird über die Synovia sowie vom durchbluteten subchondralen Knochen aus *per diffusionem* ausreichend mit Nährstoffen versorgt. Seine Ernährung steht jedoch in enger Abhängigkeit zu einer intermittierenden Belastung im Gelenk. Als bradytrophes Gewebe ist er optimal an eine reduzierte Sauerstoffspannung ( $< 1-10\% O_2$ ) und limitierte Nährstoff-Versorgung angepasst (Archer und West, 2003). Im Hinblick auf die Funktion der Gelenke ist der hyaline Gelenkknorpel wohl die interessanteste und vielseitigste aber auch die am stärksten belastete und durch seine kritische Nährstoffversorgungssituation und Zellarmut anfälligste anatomische Struktur im Gelenk. Zusätzlich benachteiligt den Gelenkknorpel seine äußerst geringe Regenerationsfähigkeit nach Trauma und Verletzungen.

Der gesunde hyaline Gelenkknorpel kann jedoch gewöhnlich den erheblichen täglichen Belastungen, die ein Mehrfaches des eigenen Körpergewichts übersteigen können (Mensch: bis  $400 \text{ kg/cm}^2$ ), schadenfrei standhalten (Martinek, 2003). Durch seine enorme Druckelastizität, seine Verformbarkeit und reibungslose Gleitfähigkeit (Viskoelastizität) ist er optimal angepasst an die lebenslangen Beanspruchungen. Im Zusammenwirken mit der Synovia ermöglicht er einen reibungsfreien Bewegungsspielraum zwischen Gelenkkopf und -pfanne. Das gesunde Knorpelgewebe enthält nur einen einzigen Zelltypen, die Knorpelzellen (Chondrozyten), die in ihrem eigenen Syntheseprodukt, der extrazellulären Knorpelmatrix (ECM), in Knorpelzellhöhlen (Lakunen) eingemauert sind (Archer und West, 2003). Der

zelluläre Anteil des Knorpels beträgt jedoch nur etwa 2-10% des Knorpelgesamtvolumens, 90-98% dagegen bestehen aus der ECM (Stockwell, 1978). Dieser hohe Matrixanteil im Knorpel, produziert von den Chondrozyten, spiegelt deren hohe Synthesekapazität wieder. Die ECM ist der eigentliche Funktionsträger im Knorpel und vermittelt seine typischen Eigenschaften. Wesentliche Bestandteile dieser Matrix sind Kollagene und Proteoglykane (60% und 25-35% der Trockenmasse). Zweifelsfrei das häufigste und spezifische Kollagen im Knorpel ist Kollagen Typ II (90-95% der Kollagene im Knorpel gehören zum Typ II). Unter den Proteoglykanen ist das große aggregierende Proteoglykan Aggrekan funktionell sehr bedeutsam und gekennzeichnet durch eine extrem hohe Wasserbindungskapazität (Poole et al., 2001). Die optimale Funktion des Knorpels ist begründet in seiner spezifischen Knorpelmatrixarchitektur, deren prägender Bestandteil ein arkaden- oder netzartig strukturiertes Maschenwerk aus kollagenen Fibrillen unterschiedlicher Dicke ist, das durch die großen Proteoglykan-Aggregate, die dessen Zwischenräume mit ihrer enormen Wasserbindungskapazität unter Spannung halten, zusätzlich stabilisiert wird. Der Quellungsdruck, den diese Aggregate durch zahllose sich gegenseitig abstoßende negative Ladungen und ihre starke Wasserbindung erzeugen, wird durch die Rahmenkonstruktion des Kollagennetzwerkes begrenzt und ist die Grundlage für die Viskoelastizität und damit die besondere Druckstabilität und Widerstandskraft des Knorpels.

In Anpassung an unterschiedliche Belastungen und biomechanische Kräfte an der Knorpeloberfläche und in der Tiefe, sowie an die durch den Diffusionsprozess resultierenden Nährstoff- und Sauerstoffgefälle, folgt der Gelenkknorpel in seinem Aufbau einer zonalen Gliederung. Diese Gelenkknorpelzonen unterscheiden sich hinsichtlich des Verlaufes und der Dicke der Kollagenfibrillen, Gehaltes und Art der Proteoglykane sowie der Menge gebundenen Wassers, Größe, Form und Anordnung der Chondrozyten (Poole et al., 2001; Martinek et al., 2003) (Abb. 1). Die *oberflächliche Knorpelzone* (Superficialzone) ist am dünnsten und enthält ovale, oberflächenparallel angeordnete Knorpelzellen mit geringerer metabolischer Aktivität. Feine Kollagenfibrillen bilden hier in Anpassung an entstehende Scherkräfte bei Gegeneinanderverschiebung des Gelenkkopfes in der –pfanne horizontale Bögen. In der oberflächlichen Zone des Knorpels wird zudem ein spezifisches zytoprotektives Protein gebildet, Lubrizin, das die reibungsfreie Gleitfähigkeit der besonders beanspruchten Knorpeloberflächen gegeneinander unterstützt und ein unkontrolliertes Wachstum der Synovialzellen inhibiert (Flannery et al., 1999). Die *mittlere Knorpelzone* (Übergangszone) ist geprägt von runden Chondrozyten, eingebettet in einem etwas gröber konstruierten Kollagennetz. In der *tiefen Zone* sind die Chondrozyten dagegen säulenartig übereinander

gestapelt, geschützt von einem Netzwerk kräftiger vertikal orientierter Kollagenfibrillen. Eine kalzifizierende Knorpelmatrix mit tendenziell blasenartigen hypertrophen Knorpelzellen dominiert die Verkalkungszone, die insbesondere die stabile Verankerung der hier kräftigen Kollagenfibrillen und damit einen homogenen Übergang sowie eine belastbare Verbindung mit dem subchondralen Knochen herstellt. Sie beginnt an einer deutlich erkennbaren Grenzlinie der *Tidemark*. Als Korrelat ihrer hypertrophen Differenzierungsrichtung exprimieren die Chondrozyten in der *Verkalkungszone* u. a. Kollagen Typ X.



**Abb. 1: Zonale Gliederung des Gelenkknorpels.** Der hyaline Gelenkknorpel lässt sich in 4 Zonen einteilen. Die Dicke der Kollagenfasern nimmt von den oberflächlichen zu den tieferen Schichten zu. Die extrazelluläre Matrix unterscheidet sich auch innerhalb der Schichten in ihrer Zusammensetzung, so dass eine interterritoriale, territoriale und perizelluläre Matrix unterschieden werden kann.

Die Zonengliederung lässt sich als optimierte Anpassung an definierte biomechanische Belastungsverhältnisse im Knorpel verstehen und ist der Garant für seine stabile Verbindung mit dem subchondralen Knochen. Auch innerhalb der Knorpelzonen gibt es Unterschiede in der Organisation, Reifungszustand und Verteilung von Komponenten der extrazellulären Matrix, so dass man eine unmittelbar um die Zelle befindliche *perizelluläre*, eine die Lakunen umgebende *territoriale* und von den Zellen weiter entfernte *interterritoriale* Matrix abgrenzen kann. Die einzelnen Chondrozyten sind in einer Kapsel aus spezifischer perizellulärer Matrix in sogenannten *Chondronen* organisiert. Chondrone haben ein umgekehrt Tropfen-förmiges Erscheinungsbild und fungieren als metabolische und biomechanische Funktionseinheiten (Poole, 1997). Diese Anordnung gewährleistet einen zusätzlichen Schutz der Knorpelzellen, da sich die Matrix bei der ständigen intermittierenden mechanischen Belastung unweigerlich stetig reversibel verformt. Bei diesen Vorgängen können sich jedoch die gesamten Chondrone in der Matrix gegeneinander leicht verschieben, so dass die einzelnen Knorpelzellen keinen Schaden nehmen (Hughes et al., 2005).

Zwischen den Chondrozyten und ihrer spezifischen extrazellulären Matrix besteht eine intensive Wechselwirkung, die für das Überleben der Chondrozyten und den Erhalt ihres differenzierten Phänotyps eine essentielle Grundvoraussetzung darstellt (Hirsh et al., 1997; Cao et al., 1999). Wichtige Vermittler im Informations- und Signalfluß zwischen Chondrozyt und ECM sind die Integrin-Rezeptoren (Loeser, 2000, 2002; Knudson und Loeser, 2002). Verschiedene Integrintypen sind auf Chondrozyten exprimiert (Loeser, 2000, 2002). Integrine sind Transmembranproteine, die die Knorpelzellmembran mit spezifischen Liganden aus der ECM vernetzen (Giancotti, 2000) und eine kontinuierliche Verbindung dieser Verknüpfungspunkte (*focal adhesion sites*) mit dem Zytoskelett herstellen sowie bei ihrer Aktivierung intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Über Integrin-vermittelte Signalwege können die wenigen Chondrozyten das permanente Remodelling, den kontrollierten Abbau bei gleichzeitiger Neusynthese von ECM-Komponenten, der gesamten ECM koordinieren.

Das Matrix-Remodelling ist eine wichtige Voraussetzung für die Erneuerung verbrauchter Matrix-Komponenten und die Ausbesserung von Mikroläsionen im Knorpel, und damit essentiell für die dauerhafte Integrität des Gelenkknorpels. Als Mechanismen des Remodellings dienen katabole Enzyme insbesondere aus der Familie der Matrix MetalloProteinasen (MMPs) und ADAM-TSs (A Disintegrin-like And Metalloprotease domain [reprolysin-type] with Thrombospondin motifs). Diese Enzyme können verschiedene Komponenten des ECM spalten. Auf molekularer Ebene bleibt die Steuerung dieser komplexen Prozesse jedoch noch unklar. Gerät das fein abgestimmte Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese, -deposition, -abbau und -erneuerung aus dem Gefüge, verliert der Knorpel seine Integrität und Belastbarkeit. Störungen der Knorpelhomöostase durch Trauma, Über-, Fehlbelastung oder chronische Entlastung, sowie genetische, stoffwechselbedingte und viele andere noch unbekannte Faktoren führen damit zu Knorpelerkrankungen - eine sehr verbreitete Knorpelerkrankung ist die Arthrose (Ge et al., 2006). In Deutschland lag die Zahl diagnostizierter Kniegelenks-Arthrosen bei 5 Millionen (Wehling et al., 2007).

Zum weiteren Verständnis der Knorpelbiologie sowie der Pathogenese von Knorpelerkrankungen, ist die Kultivierung von Knorpelzellen *in vitro* ein unentbehrliches Werkzeug geworden. Sie hat in den letzten Jahren zudem immer mehr Interesse in der Hoffnung auf einen autologen Gewebeersatz als Mittel zur Verbesserung der Heilung von Knorpelverletzungen gefunden (Lin et al., 2006). Nach enzymatischer Trennung aus ihrer spezifischen Matrix können Knorpelzellen *in vitro* kultiviert werden. Allerdings ist die Kultur der Chondrozyten auf zweidimensionalen Oberflächen wie Zellkulturflaschen mit einem raschen Verlust ihrer spezifischen Differenzierungsmarker verbunden (Benya und Shaffer,

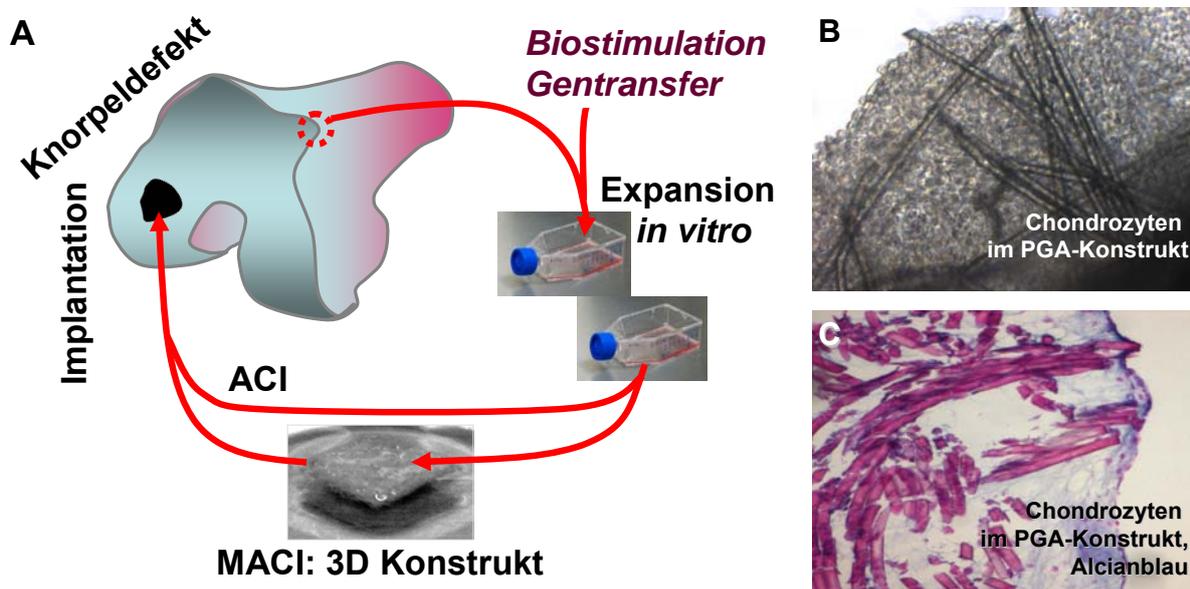
1982; Martin et al., 1999; Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c; Darling und Athanasiou, 2005). Für eine Chondrozyten-Langzeitkultur sind deshalb nur dreidimensionale (3D) Kultursysteme wie z. B. die Pellet-, Massen- oder Alginatkultur sinnvoll (Benya und Shaffer, 1982; Häuselmann et al., 1994, 1996; Lemare et al., 1998; Schulze et al., 2000; Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c) oder die Anzucht auf künstlichen 3D Biomaterialien (Erggelet et al., 2007). In der Monolayerkultur verlieren die Chondrozyten ihre Synthesekapazität für den Knorpelmarker Kollagen Typ II sowie chondrozytenspezifische Proteoglykane wie Aggrecan und produzieren stattdessen vermehrt andere Matrixproteine wie Fibronectin und Proteoglykane wie Versikan. Auch das Profil ihrer Oberflächenrezeptoren, insbesondere der Integrine als essentielle Zell-Matrixrezeptoren, die eine wesentliche Rolle in der Knorpelhomöostase spielen (Knudson und Loeser, 2002), verändert sich in Anpassung an die modifizierte extrazelluläre Knorpelmatrix (Goessler et al., 2005, 2006). Dabei nehmen dedifferenzierende Chondrozyten einen Fibroblasten-ähnlichen mesenchymalen Phänotyp ein (Schnabel et al., 2002).

In zurückliegenden Arbeiten wurde gezeigt, dass dedifferenzierte Chondrozyten in 3D Knorpelkulturen wie der Alginat- und Massenkultur redifferenziert werden können (Bonaventure et al., 1994; Häuselmann et al., 1994, Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c; Haisch et al., 2006). Nach längerer Zeit werden diese Veränderungen jedoch irreversibel (Benya und Shaffer, 1982; Häuselmann et al., 1994; Lemare et al., 1998; Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c).

## **1.2 Gelenkknorpelverletzungen, Knorpelzelltransplantationen, sekundäre Arthrose**

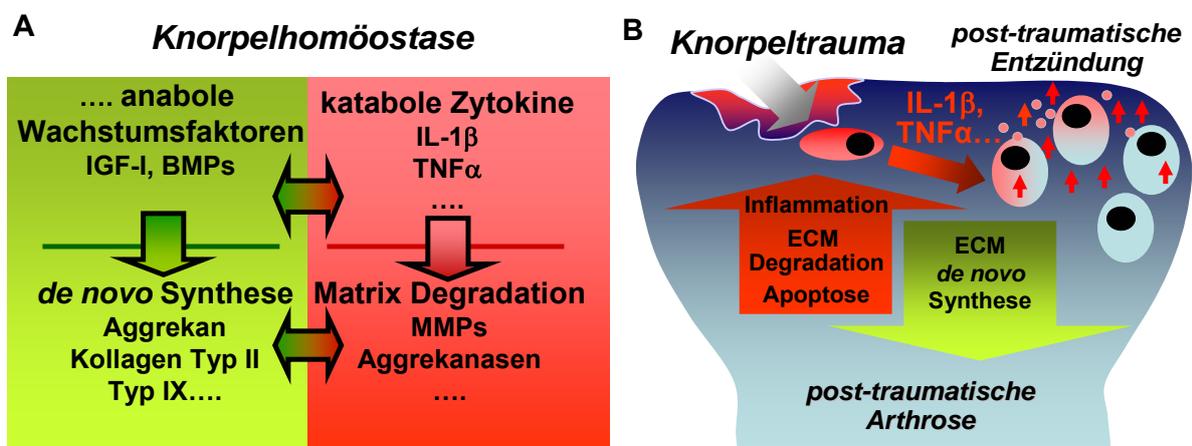
Vor allem im Hinblick auf die Nutzung *in vitro* kultivierter Chondrozyten für die Heilung von therapiebedürftigen traumatisch entstandenen Knorpeldefekten als „Autologe Chondrozyten Implantation (ACI)“ stellt die Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Kultur ein großes Problem dar. Da die Heilungsfähigkeit des Gelenkknorpels äußerst begrenzt ist (Cuciarini und Madry, 2005), werden größere und tiefere unbehandelte Gelenkknorpeldefekte meist durch ein faserknorpelartiges Ersatzgewebe ausgefüllt, das den dauerhaften Gelenkbelastungen langfristig jedoch nicht gewachsen ist. Unter Belastung abgerieben, wird es zum Ausgangspunkt für eine sogenannte post-traumatische Arthrose. 1994 und 1999 haben Brittberg und Kollegen vielversprechende Langzeitergebnisse zur ACI an einem größeren Patientenkollektiv als Möglichkeit zur Verbesserung der Knorpeldefektheilung veröffentlicht und damit zahlreiche weitere Untersuchungen und ein zunehmendes klinisches Interesse an dieser Methode ausgelöst. Für eine ACI wird dem Patienten arthroskopisch eine

Knorpelbiopsie aus einem nicht belasteten Gelenkareal entnommen, die *in vitro* isolierten autologen Chondrozyten anschließend in der Kultur vermehrt, um dann in ausreichender Menge in den aufgefrischten Knorpeldefekt des Patienten implantiert zu werden (Abb. 2). Eine wesentliche Problematik bei der ACI stellt jedoch die ausreichende Vermehrung von Chondrozyten *in vitro* dar, die derzeit nur in der Monolayerkultur unter der Gefahr ihrer vollständigen Dedifferenzierung gelingt. Bei ihrer Proliferation im Monolayer dedifferenzierte Chondrozyten sind für eine Defektheilung nicht mehr geeignet. Um den differenzierten Phänotyp der Chondrozyten zu erhalten – oder dedifferenzierte Chondrozyten zu redifferenzieren – kommen vor allem 3D Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte experimentell zur Anwendung, da sie die natürlichen Bedingungen der Knorpelzellen, nämlich den 3D Zellkontakt zur extrazellulären Matrix eher ermöglichen als eine Monolayerkultur. Dafür werden Chondrozyten auf verschiedene biodegradierbare künstliche Matrices „Scaffolds“ eingesät oder in Hydrogele suspendiert, gegebenenfalls kombiniert mit einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren, um den differenzierten Phänotyp der Chondrozyten zu erhalten (Nesic et al., 2006), bevor sie in den Knorpeldefekt als „Matrix Assistierte Autologe Chondrozyten Implantation (MACI)“ implantiert werden (Kuo et al., 2006; Nesic et al., 2006).



**Abb. 2: Prinzip der ACI und MACI.** A: Für die Therapie traumatisch entstandener Gelenkknorpeldefekte finden Autologe Chondrozyten Implantationen Anwendung. Autologe Chondrozyten werden hierfür aus einem wenig belasteten Knorpelbereich entnommen, in einer Monolayerkultur vermehrt und entweder direkt in den Knorpeldefekt implantiert (ACI) oder zur Redifferenzierung und Matrixsynthese in eine 3D-Kultur oder auf ein Biomaterial verbracht und dann als stabiles Knorpelzell-Matrix-Konstrukt implantiert (MACI). Durch die Wahl geeigneter biodegradierbarer Trägermaterialien und Biostimulation der Chondrozyten mit rekombinanten Wachstumsfaktoren, anti-inflammatorischen Zytokinen oder Transfer entsprechender Transgene könnte die Neusynthese der extrazellulären Matrix in der 3D Kultur gefördert werden. B, C: Chondrozyten auf einem PGA (Poly-glycolic acid) Scaffold. C: Alcianblaufärbung zur Darstellung von Proteoglykanen

Trotz vielversprechender Ergebnisse zu Beginn, führte keine der bisher erprobten Techniken zu befriedigenden Langzeitergebnissen für die Knorpeldefektbehandlung (Nesic et al., 2006). Deshalb nimmt die Erforschung und Optimierung neuer Biomaterialien für die Besiedlung mit Chondrozyten im Hinblick auf Knorpelzelltransplantationen in traumatisch bedingte Knorpeldefekte viel Raum ein. Als typische Folge mechanischer Gewebeerletzungen ist auch der traumatische Knorpeldefekt von einer vorübergehenden lokalen Entzündungsreaktion als komplexe Stressreaktion betroffener und benachbarter Zellen im Gewebeverband begleitet (Buckwalter, 2002; Buckwalter und Brown, 2004; Burrage et al., 2006). Durch die initiale Knorpelverletzung und weiteren forcierten Abrieb im Defektbereich werden zudem Matrixbruchstücke wie z. B. Fibronektinfragmente freigesetzt, die zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine führen (Yasuda, 2006). Diese stören die Homöostase des Knorpels, die geprägt ist von einem fein abgestimmten dynamischen Gleichgewicht zwischen anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen, anabolen und katabolen Wachstumsfaktoren sowie anti- und pro-apoptotischen Regulatoren (Abb. 3). Durch das Übergewicht entzündlicher und kataboler Faktoren werden weitere Chondrozyten und Synovialzellen aktiviert und setzen ihrerseits vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren frei, die den Entzündungsprozess dauerhaft unterhalten können (Blanco, 1999; Ge et al., 2006: s. Abb. 3B). Diese verstärkte post-traumatische Entzündungsreaktion kann zu einer sekundären Arthrose führen. Eine vermehrte Chondrozytenapoptose scheint eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der post-traumatischen Arthrose zu haben, denn nach einem Knorpeltrauma wird eine erhöhte Apoptoserate von Chondrozyten beobachtet (Borrelli und Ricci, 2004; Vrahas et al., 2004; Borrelli, 2006; Martin und Buckwalter, 2006).



**Abb. 3A-B: Knorpelhomöostase und Knorpeltrauma.** A: Die Homöostase im Gelenkknorpel beruht auf einem ausgewogenen Wechselspiel zwischen anabolen und katabolen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mediatoren (modifiziert nach Aigner und Stöve, 2003). B: Stressfaktoren wie ein Knorpeltrauma induzieren direkt und indirekt katabole Mediatoren, die zu einer Zerstörung der Knorpelmatrix und einer post-traumatischen Arthrose führen können (Vrahas et al., 2004; Burrage et al., 2006; Ge et al., 2006).

In diese post-traumatische Entzündungsreaktion mit Induktion von entzündlichen Zytokinen im Knorpel könnte außerdem auch die Aktivierung des Komplementsystems, wie bei anderen traumatischen Gewebeverletzungen, involviert sein (John et al., 2007a).

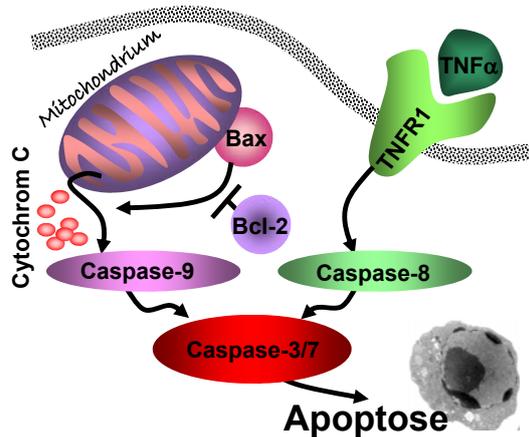
In der Pathogenese der Arthrose spielen als pro-inflammatorische Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 eine zentrale Rolle (Fernandes et al., 2002; Burrage et al., 2006; Nestic et al., 2006) (Abb. 3B), indem sie verschiedene katabole Prozesse und eine vermehrte Chondrozytenapoptose im Knorpel auslösen (Fernandes et al., 2002). Diese pro-inflammatorischen Zytokine werden mit der Synovialflüssigkeit im Gelenk verteilt und induzieren dann eine Kaskade von katabolen und entzündlichen Mediatoren, die zu dem typischen Krankheitsbild der Arthrose, verbunden mit Entzündung, Schmerz und der irreversiblen Knorpeldestruktion führen (Chikanza und Fernandes, 2000). Vermittelt durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  werden weitere pro-inflammatorische Regulatoren, nämlich Zytokine, Chemokine und andere Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO) oder die Cyclo Oxygenase(COX)-2 freigesetzt. Wichtige durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  regulierte katabole Faktoren sind aber auch die MMPs (Hedbom und Häuselmann, 2002). Diese Enzyme bilden eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die Komponenten der ECM, wie z. B. Kollagen Typ II, gezielt abbauen. Sie sind somit für die Zerstörung des Knorpels maßgeblich verantwortlich (Cho et al., 2003; Burrage et al., 2006). Mehrere Studien zeigen, dass vor allem MMP-13 eine erhebliche Bedeutung in der Arthroseentstehung zukommt (Liacini et al., 2003; Forsyth et al., 2005). MMP-13 kann, neben dem Proteoglykan Aggrekan, auch Kollagen Typ II, das wichtigste Knorpelkollagen, abbauen (Billinghurst et al., 2000; Burrage et al., 2006). Aber ebenso wurden zahlreiche andere MMPs und Aggrekanasen (MMP-2, -3, -14, ADAMTS-1, -4, -5 u. a.), die weitere Matrixkomponenten spalten können, im Knorpel nachgewiesen (Hedbom und Häuselmann, 2002; Aigner und Stöve, 2003).

Die verminderte Expression der Tissue Inhibitors of MetalloProteinases [TIMPs] als natürliche, lokale MMP-Inhibitoren, vornehmlich supprimiert durch IL-1 $\beta$ , führt zu einem Ungleichgewicht zwischen neu synthetisierten MMPs und TIMPs und damit einem gesteigerten Abbau der extrazellulären Knorpelmatrix und aufgrund der anti-apoptischen Eigenschaften der TIMPs, zu einem vermehrten Rückgang vitaler Chondrozyten (Mannello und Gazzanelli, 2001; Aida et al., 2005).

Zusätzlich hemmen diese pro-inflammatorischen Zytokine die Synthese von knorpelspezifischen Matrixproteinen wie Kollagen Typ II (Seguin und Bernier, 2003), Link-Proteinen, Aggrekan und anderen knorpeltypischen Proteoglykanen, die für die Funktion des Knorpels, seine Homöostase, Differenzierung und schließlich das Überleben der

Knorpelzellen von außerordentlicher Bedeutung sind (Cho et al., 2003; Schulze-Tanzil et al., 2004a,d).

Die durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierte Apoptose teilt man üblicherweise in einen Todesrezeptor abhängigen (extrinsischen), z. B. über den TNFR1 vermittelten, und einen Rezeptor unabhängigen (mitochondrialen, intrinsischen) Signaltransduktionsweg ein (Abb. 4).



**Abb. 4:  $\text{TNF}\alpha$ -induzierte extrinsische und intrinsische Apoptosewege.** Der extrinsische Apoptoseweg beginnt mit einer Bindung von  $\text{TNF}\alpha$  an den TNFR1 und führt über eine Aktivierungskaskade der Caspasen-8, -3 und -7 zum Tod der Zelle. Die intrinsisch vermittelte Apoptose entsteht aus einer Dysregulation Mitochondrien assoziierter Proteine wie u. a. Bax und Bcl-2, welche in eine Cytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien mündet. Diese ist gefolgt von einer Caspase-Kaskade über die Caspasen-9, -3 und -7.

Durch ein genaueres Verständnis der molekularen Abläufe in der Arthrosepathogenese hofft man auf neue innovative Ansatzpunkte für ihre Therapie. Derzeit muß die Arthrose noch immer als unheilbare Krankheit betrachtet werden, die eine lebenslange Therapie erfordert. In der Hoffnung auf eine bessere und langfristige Verträglichkeit wurden mittlerweile verschiedene Phytopharmaka auf ihre Wirksamkeit in der Arthrosetherapie geprüft und sind in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Ahmed et al., 2002; Garbacki et al., 2002; Singh et al., 2002, 2003; Fajardo und Di Cesare, 2005; Minich et al., 2007).

Da die aktive Arthrose von einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren geprägt ist (Blanco, 1999), könnte sich eine verstärkte Expression knorpelgener immunregulatorischer Faktoren oder Zytokine vorteilhaft im entzündeten Knorpelgewebe auswirken (Gelse et al., 2003).

### 1.3 Interleukin-10

Im Knorpel konnten bisher die immunregulatorischen, anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 nachgewiesen werden (Cawston et al., 1996; Tanabe et al., 1996; Moos et al., 1999; Iannone et al., 2001; Fernandes et al., 2002; Schuerwegh et al., 2003). Für diese Zytokine wurde in anderen Zelltypen ein anti-inflammatorisches Potential gezeigt (Katsikis et al., 1994). Das immunregulatorische Zytokin IL-10 ist als wichtiger Immunmodulator im Körper bekannt. IL-10 tritt im osteoarthritischen Knorpel in erhöhter Konzentration auf (Iannone et al., 2001; Fernandes et al., 2002). Die Frage nach einer möglichen Bedeutung in

der Arthrose bleibt bislang unbeantwortet. Offensichtlich wird es nicht nur von einer Vielzahl von Immunzellen gebildet, mit den Antigen-präsentierenden Zellen als Hauptziel von IL-10, sondern auch Bindegewebszellen wie Fibroblasten und Chondrozyten können es produzieren und sind für IL-10 sensibel (Reitamo et al., 1994; Iannone et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Moroguchi et al., 2004; Ouyang et al., 2004). Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen mit IL-10 haben einen chondroprotektiven Effekt bei Gelenkentzündungen aufzeigen können (Lechman et al., 1999; Lubberts et al., 2000; Neumann et al., 2002; Finnegan et al., 2003; Zhang et al., 2004). Die direkte Wirkung von IL-10 auf die Chondrozyten selbst ist kaum untersucht und bleibt unklar.

Neben dem klassischen IL-10 werden von verschiedenen Viren wie z. B. dem Epstein Barr Virus zur Unterdrückung der Immunabwehr des Wirtes verschiedene virale IL-10 Homologa gebildet (Hsu et al., 1990). Das virale IL-10 ist dem humanen IL-10 Protein zu 84% identisch. Es weist ähnliche Effekte wie humanes IL-10 auf, ihm fehlen aber wahrscheinlich dessen immunstimulatorische Eigenschaften (Lechmann et al., 1999). Bei Bindung von IL-10 an seinen Rezeptorkomplex wird der JAK-STAT Signalweg aktiviert. STAT Proteine sind latente zytoplasmatische Proteine, die bei Stimulation von Zytokinrezeptoren wie z. B. dem IL-10 Rezeptorkomplex über eine Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden und dann in den Zellkern translozieren, um als Transkriptionsfaktoren die Genexpression von STAT-regulierten Genen u. a. die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase (iNOS), das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül-I (ICAM-I) und den Major Histocompatibility Complex-II zu regulieren (Legendre et al., 2003; Donnelly et al., 2004; Zdanow, 2004).

Verschiedene Untersuchungen in anderen Zelltypen haben gezeigt, dass IL-10 die Signalübertragung pro-inflammatorischer Zytokine z. B. eine hochregulierte MMP-Expression hemmen kann (Reitamo et al., 1994; Wang und Lou, 2001; Moroguchi et al., 2004). Dennoch bleibt der zugrundeliegende Mechanismus unklar. IL-10 kann die beiden Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-3 aktivieren (Donnelly et al., 2004). STAT-1 und -3 induzieren dabei gegensätzliche Effekte, eine STAT-1 Aktivierung kann Apoptose, eine STAT-3 Aktivierung Zellproliferation induzieren (Stephanou und Latchman, 2005). Dies könnte eine Erklärung für Zelltyp-abhängige Wirkungen von IL-10 auf Proliferation und Apoptose sein. Qing und Kollegen (2003) konnten in Hepatozyten zeigen, dass IL-10 zur Aktivierung von STAT-3 führt und gleichzeitig die TNF $\alpha$  Expression hemmt. In diesem Sinne zeigten Chappell und Kollegen (2000), dass STAT-3 desweiteren regulatorisch auf die TNF $\alpha$  Expression wirken kann als Hinweis auf einen möglichen Antagonismus zwischen TNF $\alpha$  und IL-10.

Abhängig vom Zelltyp scheint IL-10 anti-apoptotische Eigenschaften zu entfalten (Zhou et al., 2001). Wang und Lou (2001) berichten von einer Hemmung der durch IL-1 $\beta$  induzierten Apoptose in Chondrozyten der Ratte, die mit IL-10 stimuliert wurden. Im Gegensatz dazu konnten in inflammatorischen Zelltypen wie Mastzellen auch pro-apoptotische Effekte von IL-10 aufgezeigt werden (Bouton et al., 2004). Die anti-apoptotischen Signalwege von IL-10 sind im Einzelnen noch nicht aufgeklärt. Es erscheint plausibel, dass IL-10 mit mitochondrialen Apoptosewegen interagiert. Dementsprechend konnten Oberholzer et al., (2001) eine gesteigerte Expression des anti-apoptotischen mitochondrialen Faktors Bcl-2, induziert durch eine IL-10 Überexpression in Thymozyten nachweisen. Bcl-2 spielt eine wesentliche Rolle für den Erhalt des Überlebens der Chondrozyten (Feng et al., 1998). Außerdem reguliert Bcl-2 neben seinem anti-apoptotischen Potential die Chondrozyten-Morphologie und Expression von dem Knorpelmarker Aggrekan in Chondrozyten (Feng et al., 1999; Yagi et al., 2005). Der Effekt von IL-10 auf die Aktivierung von Caspasen, die eine Rolle in der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose spielen, wie die bei Bindung an den TNFR1 aktivierte Initiator-Caspase-8 bleibt unklar (Cohen, 1997; Rath und Aggarwal, 1999; Heyninck und Beyaert, 2001; Garg und Aggarwal, 2002).

Der Nachweis von IL-10 und des IL-10 Rezeptors konnte im Knorpel durch Iannone et al., (2001) erbracht werden. Wang und Lou (2001) studierten den Effekt von IL-10 auf Chondrozyten und konnten eine direkte protektive Wirkung gegenüber den Effekten einer IL-1 $\beta$  Stimulation, denn sowohl der Zelltod wie auch die MMP-3 und NOS-2 Induktion wurde durch IL-10 herabgesetzt, feststellen. Diese Ergebnisse werden unterstützt von einer Untersuchung von Fernández und Kollegen (2003). Sie fanden heraus, dass die Haemoxygenase, ein offenbar protektives Enzym, durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-17 und TNF $\alpha$  herabreguliert wurde, aber durch IL-10 in Chondrozyten induziert werden konnte (Fernández et al., 2003). Van Roon und Kollegen (1996) berichteten, dass IL-10 direkt die Proteoglykansynthese im Knorpel stimuliert. Das Wissen über die durch STAT-1 und -3 in Chondrozyten induzierte Signalübertragung ist noch gering. Radons und Kollegen (2006) gelang es nicht, in einer Chondrosarkoma Zelllinie durch IL-10 Stimulation eine STAT-3 Aktivierung zu zeigen, obwohl auch sie eine mRNA Expression des IL-10 Rezeptors in dieser immortalisierten Zelllinie nachweisen konnten. STAT-3 ist ein typischer Überlebensfaktor in verschiedenen Zelltypen (Haura et al., 2005).

Im Falle einer anti-inflammatorischen und -apoptotischen Wirkung von IL-10 oder einer antagonistischen Wirkung gegenüber pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , wäre IL-10 interessant für die Arthrotherapie z. B. im Rahmen einer Gentherapie mit IL-10. Eine

Gentherapie beinhaltet den Transfer eines therapeutischen Fremdgens z. B. IL-10 in eine Wirtszelle mittels viraler oder nicht viraler Vektoren. Eine IL-10 Überexpression direkt in Chondrozyten, die in einen Knorpeldefekt transplantiert werden, könnte aber eine streng lokalisierte Quelle für kontinuierliche Zytokinkonzentrationen im Knorpeldefekt unter besserer Vermeidung systemischer, immunsuppressiver Nebeneffekte darstellen. Es gibt verschiedene gentherapeutische Ansätze zur Optimierung der Knorpelheilung durch allogene Expression von anabolen Wachstumsfaktoren, Hemmung kataboler Mediatoren oder regulatorischer Zytokine (Gelse et al., 2003; Cucchiariini und Madry, 2005; Madry et al., 2004; 2005; Cucchiariini et al., 2005; Gelse und Schneider, 2006). Ein therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Gelenkentzündungen unter Verwendung einer IL-10 Überexpression in Knorpelzellen im Rahmen einer ACI ist noch nicht erfolgt. Die retrovirale Transduktion von Synovialzellen mit dem immunregulatorischen Zytokin IL-10 in Kombination mit einem IL-1R1 durch Injektion der entsprechenden Vektoren in den Gelenkraum, führte zur stabilen Transgenexpression für 14 Tage und zur deutlichen Hemmung des Knorpelabbaus (Zhang et al., 2004). Eine Applikation eines Vektors in die Gelenkhöhle erfordert hohe Vektorkonzentrationen und kann jedoch nur zur Transfektion der Zellen der Synovialmembran führen, da die dichte Knorpelmatrix für die meisten Vektoren undurchdringlich ist und somit die Knorpelzellen nicht erreicht werden können. Lediglich über die Verwendung von Adeno-assoziierten Viren als Vektoren konnte eine *in vivo* Transfektion von Knorpelzellen im Gelenk erreicht werden (Madry et al., 2003).

Es gibt derzeit noch keine veröffentlichten Ergebnisse zu einer Überexpression von humanen IL-10 in Chondrozyten. Studien mit einem Arthritismodell in einer IL-10 Knock out Maus bestätigen das chondroprotektive Potential von IL-10 *in vivo* (Cuzzocrea et al., 2001; Finnegan et al., 2003). Auch lassen Tiermodelle mit lokaler Injektion von IL-10 Vektoren oder anti-IL-10 Antikörpern ins Gelenk vermuten, dass die Gentherapie mit einer IL-10 Überexpression eine nützliche Strategie in der Behandlung von Gelenkentzündungen sein könnte (Lechman et al., 1999, 2003; Neumann et al., 2002; Van de Loo und Van den Berg, 2002; Trachsel et al., 2007).

## 2 Zielstellung

Der Fokus meiner Forschung der letzten Jahre bezog sich auf die Analyse von Zusammenhängen bei der De- und Redifferenzierung von Chondrozyten in 3D Kulturen zur Optimierung der Chondrozytenkultur für die Vorbereitung von Knorpelzelltransplantationen (Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c; Haisch et al., 2006). Besonderen Stellenwert hatte dabei die Bedeutung der Integrin vermittelten Zellmatrix-Interaktion, die eine essentielle Rolle für das Überleben der Chondrozyten und ihren differenzierten Phänotyp spielt (Schulze-Tanzil et al., 2001; Shakibaei et al., 2001). Im Folgenden rückten die katabolen Wirkungen pro-inflammatorischer Zytokine in Gelenkchondrozyten und ihre Inhibition durch Phytopharmaka vor dem Hintergrund der Arthrose in den Mittelpunkt des Interesses. Eine NF- $\kappa$ B Hemmung wurde als potentieller Schlüsselwirkungsmechanismus in Betracht gezogen (Schulze-Tanzil et al., 2002a, 2004a,d; Shakibaei et al., 2005a, 2007). Das Ziel gegenwärtiger Forschungsarbeiten richtet sich auf ein besseres Verständnis des auto- und parakrinen Wechselspiels zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Knorpel und der durch sie induzierten katabolen und anabolen Mediatoren. Daraus entstand die Hypothese einer gestörten Immunregulation im Gelenk als Auslöser für Gelenkentzündung und post-traumatische Arthrose. Die Beeinflussung dieser fehlgeleiteten Immunreaktion könnte als therapeutischer Ansatzpunkt in Frage kommen. Da IL-10 in anderen Zelltypen ein wirkungsvolles anti-inflammatorisches und immunregulatorisches Zytokin ist, wurde es für die Untersuchungen ausgewählt und seine direkte Wirkung auf Knorpelzellen sowie seine Wechselwirkung mit TNF $\alpha$  in diesem Zelltyp genauer studiert (John et al., 2007b; Müller et al., 2008a,b). TNF $\alpha$  ist bekannt, die typischen katabolen Effekte im Knorpel, die bei Gelenkentzündungen beobachtet werden, herbeizuführen: die Suppression der Synthese spezifischer Knorpelmatrixkomponenten, den Matrixabbau, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Apoptose. Die Fragestellung zur Wirkung des Zytokins IL-10 im Knorpel wurde schließlich mit der Idee einer anti-inflammatorischen Gentherapie direkt in Knorpelzellen verknüpft und hierzu zunächst deren Transduzierbarkeit in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen (Oberholzer et al., 2007) und dann der Effekt hoher IL-10 Konzentrationen, die durch eine IL-10 Überexpression in Knorpelzellen entstehen können, studiert (Müller et al., 2008a,b).

### **3 Ergebnisse: Zusammenfassung der eigenen Arbeiten**

#### ***3.1 Dedifferenzierung und Redifferenzierungspotential von Chondrozyten***

Zur Untersuchung des Redifferenzierungspotentials dedifferenzierter Chondrozyten wurden humane Chondrozyten über 8 Passagen in der Monolayerkultur vermehrt und dann zur Redifferenzierung in ein 3D Kultursystem (Alginat- oder Massenkultur) überführt. Während der *in vitro* Proliferation in der Monolayerkultur dedifferenzierten die Chondrozyten schnell. Dedifferenzierende Chondrozyten verloren ihren Chondrozyten-typischen rundlichen Phänotyp, zeigten eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, proliferierten rasch und büßten ihr Chondrozyten-spezifisches Syntheseverhalten ein, indem sie nach der vierten Passage im Monolayer kaum noch Kollagen Typ II, sondern unspezifische Knorpelmatrixkomponenten wie Kollagen Typ I produzierten (Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c). Erste Anzeichen einer frühen Dedifferenzierung konnten bereits in der ersten Monolayerpassage beobachtet werden – ihr Ausmaß unterschied sich in Abhängigkeit von der Spenderspezies der Knorpelzellen (Schulze-Tanzil et al., 2008). Es zeigte sich außerdem, dass die starke Proliferation von Chondrozyten in der Monolayerkultur zum irreversiblen Verlust des chondrogenen Potentials nach der vierten Passage führte, denn die humanen Chondrozyten redifferenzierten nicht mehr nach Überführung in beide 3D Kultursysteme (Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c; Haisch et al., 2006).

Diese irreversible Dedifferenzierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur war begleitet von einer verringerten Expression von  $\alpha 3$ -Integrinen und Komponenten des MAPKinase Signalweges wie des Adaptorproteins Src Homology Collagen (SHC), der Extracellular signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) und einer erhöhten Apoptoserate der Zellen, erkennbar an einer verstärkten Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und morphologischen Apoptosezeichen (Schulze-Tanzil et al., 2004c). Eine andere Arbeit, die die essentielle Rolle der MAPKinase Kaskade für den differenzierten Phänotyp von Chondrozyten analysierte, zeigte, dass eine Hemmung des MAPKinase Signalweges durch Inhibition der ERK1/2 Kinase direkt zur Chondrozytenapoptose führt (Shakibaei et al., 2001). Eine ausführliche Recherche der Fachliteratur ergab ebenso Hinweise, dass die Chondrozytenapoptose durch einen Verlust von Überlebenssignalen insbesondere aus der spezifischen extrazellulären Knorpelmatrix herbeigeführt werden kann und die Interaktion zwischen Zelle und Matrix via Integrinrezeptoren hier eine zentrale Rolle im Zellüberleben zu spielen scheint (Goggs et al., 2003).

**Eigene Publikationen:**

- (P1)** Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker H-J, Scheid A, Shakibaei M (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 308: 371-9.
- (P2)** Schulze-Tanzil G, Mobasher A, de Souza P, John T, Shakibaei M (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient SHC-ERK interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 448-58.
- (P3)** Schulze-Tanzil G, Kohl B, Müller RD, Schneider N, Ertel W, Gemeinhardt O, Hünigen H, Stark R, Ipaktchi K, John T (2008). Differing *in vitro* biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: An immunomorphological study. *Histochem Cell Biol* 39-49.
- (P4)** Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ (2001). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 276: 13289-94.

### ***3.2 Integrine kooperieren mit Zelloberflächenrezeptoren und katabolen Mediatoren***

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ 1-Integrine nicht nur als typische Zell-Matrixrezeptoren mit spezifischen Matrixkomponenten im Knorpel interagieren sondern auch mit MMPs (MMP-1, -3 und -9) in der extrazellulären Matrix ko-lokalisieren und kooperieren (Schulze-Tanzil et al., 2001) und so wahrscheinlich auch in katabole Vorgänge im Knorpel involviert sind sowie aktiv am Remodelling der Matrix teilnehmen könnten.

Eine weitere Arbeit sollte die Beziehung des in Knorpelzellen bislang noch nicht nachgewiesenen VEGFR3 (Flt-4) zu  $\beta$ 1-Integrinen und dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  darstellen. Verschiedene Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptoren und VEGF-Isoformen konnten von anderen Arbeitsgruppen bereits mit Gelenkentzündungen in Zusammenhang gebracht werden (Murata et al., 2008). Hierbei konnte mit immunmorphologischen Methoden eine Ko-Lokalisation und Interaktion von VEGFR3 mit  $\beta$ 1-Integrinen und eine Induktion durch IL-1 $\beta$  beobachtet werden (Shakibaei et al., 2003). Die mit IL-1 $\beta$  behandelten Chondrozyten zeigten außerdem eine verstärkte Expression des Urokinase Plasminogen Activator Receptors (uPAR), einem ebenso mit der Pathogenese von Gelenkentzündungen in Beziehung zu betrachtenden Rezeptor. uPAR war im osteoarthritischen Knorpel in größerer Menge als im gesunden Knorpel nachweisbar. Außerdem war eine Ko-Lokalisation zwischen uPAR und MMP-9 in Chondrozyten, die mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden, zu beobachten (Schwab et al., 2004).

#### **Eigene Publikation:**

**(P5)** Schulze-Tanzil G, de Souza P, Merker H-J, Shakibaei M (2001). Co-localization of integrins and matrix metalloproteinases in the extracellular matrix of chondrocyte cultures. *Histol Histopathol* 16: 1081-9.

### 3.3 *Hemmung kataboler Effekte pro-inflammatorischer Zytokine durch Phytopharmaka in Chondrozyten*

Untersuchungen, die diesen Experimenten folgten, analysierten die Rolle pro-inflammatorischer Zytokine in Knorpelzellen genauer und stellten gleichzeitig die inhibitorische Wirksamkeit von mehreren Phytopharmaka auf die durch diese Zytokine induzierten Effekte dar. Zunächst wurden Extraktkomponenten des anti-rheumatisch wirksamen Brennesselblätterextraktes (*Urtica dioica/Urtica urens*) in ihrer Wirkung auf Chondrozyten geprüft, nämlich *Hox alpha* und die Monosubstanz *13-HOTrE* (13-Hydroxyoktadecatrienic acid). Dabei zeigten die Analysen, dass beide Extraktkomponenten die durch 100 ng/mL IL-1 $\beta$  induzierte Expression von aktiven MMP-1, -3 und -9 nach 24 h in Chondrozytenkulturen inhibieren konnten (Schulze-Tanzil et al., 2002a).

Untersuchungen zum anti-rheumatischen Effekt zweier Aufbereitungen des Extraktes (*Jucurba*® und *Jucurba forte*®) der afrikanischen Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens DC*) schlossen sich an. *Jucurba forte*® führte zu einer deutlich stärkeren Hemmung der durch IL-1 $\beta$  induzierten Synthese von MMPs (MMP-1, -3 und -9) (Schulze-Tanzil et al., 2004a). Schließlich wurde die anti-inflammatorische Wirkung von *Curcumin*, einer Hauptkomponente des Curry-Gewürzes analysiert (Schulze-Tanzil et al., 2004d; Shakibaei et al., 2007). Humane Chondrozytenkulturen wurden mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  vorstimuliert, um die inflammatorischen Bedingungen einer bestehenden Gelenkentzündung und nachfolgende Therapien anzudeuten und dann gleichzeitig mit 10 ng/mL IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  und *Curcumin* behandelt. IL-1 $\beta$  bewirkte in den Chondrozytenkulturen eine Hemmung der Expression von knorpelspezifischen Kollagen Typ II und den Zell-Matrix Rezeptoren ( $\beta$ 1-Integrinen), eine verstärkte Produktion von MMP-3, -9 und induzierte die COX-2. *Curcumin* konnte diese katabolen Wirkungen inhibieren (Schulze-Tanzil et al., 2004d; Shakibaei et al., 2007).

Zum genaueren Verständnis des Wirkungsmechanismus von *Curcumin* in Chondrozyten wurde der Einfluss von *Curcumin* auf eine durch IL-1 $\beta$  induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Erste Untersuchungen ergaben eine Hemmung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern der Chondrozyten bei gleichzeitiger Behandlung dieser mit 10 ng/mL IL-1 $\beta$  und *Curcumin* (Schulze-Tanzil et al., 2004d). Dieser Mechanismus wurde in einer späteren Arbeit genauer analysiert (Shakibaei et al., 2007). Es konnte dargestellt werden, dass *Curcumin* einer durch IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B entgegenwirken kann, indem es die für den Aktivierungsprozess notwendige I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung und die spätere

Degradation dieser inhibitorischen Komponente des NF- $\kappa$ B Komplexes hemmt sowie auch die Phosphorylierung der p65 Untereinheit und die spätere Translokation des phosphorylierten p65 in den Zellkern als Basis für eine Beeinflussung der Genexpression durch NF- $\kappa$ B behinderte (Shakibaei et al., 2007).

Eine Zusammenfassung der Fachliteratur zeigte, dass NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle in der durch TNF $\alpha$  vermittelten Signalübertragung und Apoptose durch Aktivierung verschiedener intrinsischer Signalwege spielt, allerdings auch in Signalwege, die das Zellüberleben determinieren, involviert ist (Shakibaei et al., 2005b).

**Eigene Publikation:**

(P6) Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehman I, Mobasheri M (2007). Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of Cyclo Oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 73: 1434-45.

### 3.4 Wirkung von IL-10 in Knorpelzellen

Neben einer Entzündungshemmung durch eine direkte Inhibition pro-inflammatorischer Signalwege könnte die Nutzung der Wirkung anti-inflammatorischer und damit indirekt anaboler Zytokine bei Gelenkentzündungen Vorteile bringen. Über den Einfluss des bekanntesten anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 ist im Knorpel bisher wenig bekannt. In weiteren Arbeiten konnte IL-10 in Gelenkknorpel *in situ* gezeigt werden. In den aus dem Knorpel isolierten Chondrozyten war eine IL-10 Expression auf mRNA und Protein Ebene nachweisbar. Auf mRNA Ebene war eine deutliche Hochregulation dieses Zytokins durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  (John et al., 2007b), die sich auf Proteinebene bestätigen ließ, zu beobachten. Auch die spezifischen Rezeptorketten des IL-10 Rezeptors (IL-10R1 und 2) waren in Chondrozyten auf mRNA Ebene nachweisbar. Der Vergleich mit Immunzellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen zeigte bei diesen eine deutlich höhere Expression des IL-10 spezifischen IL-10R1, wohingegen die Expression des IL-10R2 sich nicht wesentlich unterschied (Wolk et al., 2008). Der IL-10R1, der spezifisch nur IL-10 bindet - die R2-Kette wird auch für die Bindung anderer Zytokine der IL-10 Familie genutzt - war auch auf Proteinebene exprimiert. Auch andere Rezeptorketten für weitere Zytokine der IL-10 Familie (IL-20R1, IL-22R1, IL-28R1, IL-20R2, IFN $\alpha$ R1, IFN $\alpha$ R2c) waren in Knorpelzellen exprimiert (Wolk et al., 2008).

In Chondrozytenkulturen, die unter serumarmen Bedingungen kultiviert wurden, wurden wichtige Caspaseaktivitäten bestimmt. Die Behandlung mit TNF $\alpha$  für 48 h bewirkte eine Zunahme aller untersuchten Caspaseaktivitäten. Eine IL-10-Behandlung hatte dagegen im Vergleich zu den Kontrollen keine erkennbare Wirkung auf die Caspaseaktivitäten. Die Ko-Stimulation mit IL-10 und TNF $\alpha$  ließ eine Hemmung der durch TNF $\alpha$  induzierten Caspaseaktivitäten erkennen. Die Analyse der Expression mitochondrialer regulatorischer Proteine ergab, dass IL-10 durch TNF $\alpha$  induzierte intrinsische Apoptosewege in Chondrozyten offensichtlich inhibitorisch beeinflussen kann (John et al., 2007b).

Als Vorarbeiten für geplante Experimente mit einem IL-10 Überexpressionsvektor in Chondrozyten wurde die adenovirale Transduktion mit Hilfe eines adenoviralen EGFP Überexpressionsvektors etabliert. Bei adenoviraler Transduktion der Chondrozyten mit dem EGFP Vektor konnten sehr hohe Transduktionseffizienzen von > 70-98% in Chondrozyten, die aus einer Alginatkultur stammten, erzielt werden (Oberholzer et al., 2007). Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von den Kultivierungsbedingungen der

Chondrozyten: Chondrozyten, die aus einer Langzeitalginatkultur ausgewandert waren, wiesen eine deutlich höhere Transduktionseffizienz und Proliferationsrate gegenüber solchen, die nach der Isolierung nur für kurze Zeit in einer Monolayerkultur für die Transduktion angezüchtet wurden, auf (Oberholzer et al., 2007). Im Hinblick auf einen gentherapeutischen Einsatz transduzierter Chondrozyten für eine ACI wurde die Transgenexpression in 3D Chondrozytenkulturen weiteruntersucht. Chondrozyten wurden mit einem EGFP-Vektor transduziert und dann in eine 3D-Kultur überführt und für 4 Wochen weiterkultiviert. Es war eine EGFP Expression über vier Wochen durchflusszytometrisch nachweisbar, die aber deutlich sank. Der Vergleich der Transduktionseffizienz und des Expressionsverlaufes zwischen Alginat- und Monolayerkultur ergab zunächst eine höhere Expressionsrate in der Monolayerkultur (bis zum 4. Tag). Ab dem 7. Tag zeigten die Chondrozyten in der Alginatkultur jedoch signifikant höhere Expressionsraten (Müller et al., 2008a).

Die mit dem EGFP Vektor erzielten Ergebnisse wurden für Folgeexperimente mit einem IL-10 Überexpressionsvektor genutzt. Es konnte eine sehr effektive adenovirale Überexpression von humanen IL-10 in Gelenkchondrozyten erreicht werden. Die mRNA Analysen ergaben bei einer Post-Stimulation der IL-10 transduzierten mit TNF $\alpha$  eine weitere Erhöhung der IL-10 Expression. Die IL-10 Überexpression beeinträchtigte jedoch nicht die Ultrastruktur der Chondrozyten und war über mehrere Wochen in 3D Kulturen nachweisbar. Die IL-10 Überexpression hatte keine suppressive Wirkung auf die Synthese wichtiger Bestandteile der Knorpelmatrix und Integrine (Müller et al., 2008a).

Zur Analyse der Wirkungen von rekombinanten IL-10 und TNF $\alpha$  auf humane Chondrozyten wurden Chondrozytenkulturen mit TNF $\alpha$ , IL-10 oder TNF $\alpha$  und IL-10 stimuliert und dann die mRNA Expression für Hauptmatrixproteine wie Kollagen Typ II und Aggrecan bestimmt. IL-10 hatte einen signifikant stimulatorischen Einfluss auf die Kollagen Typ II mRNA Expression in Chondrozyten, während TNF $\alpha$  seine Expression hemmte (John et al., 2007b; Müller et al., 2008b). Der suppressive Effekt von TNF $\alpha$  auf die Kollagen Typ II mRNA Expression konnte jedoch nur Spender-abhängig durch rekombinantes IL-10 sowie eine IL-10 Überexpression beeinflusst werden (John et al., 2007b; Müller et al., 2008b). Die durch TNF $\alpha$  induzierte Hemmung der Aggrecan Expression wurde durch eine IL-10 Überexpression signifikant antagonisiert. Als Hinweis auf eine mögliche Matrixdegradation wurde die Expression des MMP-3 und -13 studiert. Rekombinantes IL-10 zeigte keine Wirkung auf die MMP-3 Expression, hatte aber einen schwachen und signifikant induzierenden Effekt auf die Expression von MMP-13. Die TNF $\alpha$ -Stimulation führte dagegen zu einer sehr starken Induktion beider MMPs. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  und IL-10 konnte

hier einen Antagonismus zwischen der Wirkung beider Zytokine im Hinblick auf die MMP-13 Expression aufzeigen. Schließlich wurde die Wirkung von TNF $\alpha$  und IL-10 auf die Induktion wichtiger Zytokine, die im Arthrosegeschehen eine Rolle spielen, analysiert. TNF $\alpha$  induzierte signifikant alle untersuchten Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6). IL-10 und die IL-10 Überexpression regulierte zwar TNF $\alpha$  signifikant, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als TNF $\alpha$  seine eigene Expression induzierte. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hatte IL-10 oder die IL-10 Überexpression keine Wirkung auf die untersuchten Zytokine. Die Stimulation der Chondrozyten mit IL-10 in Kombination mit TNF $\alpha$  zeigte für die IL-10 und IL-6 Expression keine signifikanten Unterschiede zur Behandlung mit TNF $\alpha$  allein. Bezüglich der IL-1 $\beta$  Induktion war eine leichte nicht signifikante inhibitorische Wechselwirkung zwischen rekombinanten IL-10 oder überexprimierten IL-10 und TNF $\alpha$  erkennbar (John et al., 2007b, Müller et al., 2008b).

**Eigene Publikationen:**

(P7) John T, Müller RD, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, Hostmann A, Tschöcke SK, Schulze-Tanzil G (2007). Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- $\alpha$  in human articular chondrocytes *in vitro*. Cytokine 40: 226-34.

(P8) Müller RD, John T, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, Hellmuth M, LaFace D, Hutchins B, Laube G, Veh RW, Tschöcke SK, Ertel W, Schulze-Tanzil G (2008). IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF $\alpha$  in human articular chondrocytes *in vitro*. Cytokine (in press).

## 4 Diskussion

### 4.1 Dedifferenzierung von Chondrozyten

Die Untersuchungen zur Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten in 3D Kulturen zeigten, dass sowohl Alginat- wie auch High-Density Kulturen für die Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten sehr gut nutzbar sind (Schulze-Tanzil et al., 2002b, 2004c) und stehen damit im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen (Bonaventure et al., 1994; Häuselmann et al., 1994). Die *in vitro* Knorpelzellbiologie und frühe Anzeichen einer Dedifferenzierung sind Spezies-abhängig und unterscheiden sich somit zwischen Chondrozyten von Mensch und Großtier (Schulze-Tanzil et al., 2008). Die Arbeiten lassen übereinstimmend den Schluß zu, dass der differenzierte Phänotyp der menschlichen Chondrozyten nach der 4. Passage im Monolayer irreversibel verloren geht, denn Redifferenzierungsversuche von Chondrozyten späterer Passagen blieben in den 3D Kulturen erfolglos. Diese Beobachtung einer irreversiblen Dedifferenzierung bestätigt Untersuchungen von Martin et al., (1999). Man könnte also Chondrozyten für eine ACI nur über maximal 4 Passagen in der Monolayerkultur vermehren, um sie dann unmittelbar vor ihrer Verwendung zur Implantation in einen Knorpeldefekt in der 3D Kultur zu redifferenzieren. Hydrogele wie Alginat sind als Biomaterial für die Besiedlung mit Chondrozyten zum Knorpelersatz aufgrund ungünstiger Formbarkeit, -stabilität und Biodegradation nicht geeignet (Metters et al., 1999; Haisch et al., 2000). Chondrozyten können aber sehr leicht für ihre weitere Nutzung aus dem Alginat durch Depolymerisation mit Chelatbildnern freigesetzt werden und dann im Sinne einer MACI auf geeignete Biomaterialien verbracht werden. Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe konzentrieren sich deshalb auf die Eigenschaften und Eignung neuer Biomaterialien für die Anzucht von Chondrozyten im Hinblick auf eine MACI. Für den Erhalt des chondrogenen Potentials der dedifferenzierten Chondrozyten und das Zellüberleben scheint darüber hinaus der MAPKinase Signalweg von großer Bedeutung zu sein (Schulze-Tanzil et al., 2004c), denn die irreversible Dedifferenzierung der Chondrozyten ging mit einer reduzierten Interaktion von Proteinen dieses essentiellen Signalweges einher (Schulze-Tanzil et al., 2004c) und die direkte Hemmung des Signalweges führte zur Apoptose (Shakibaei et al., 2001). Auf den besonderen Stellenwert des MAPKinase Weges für das Überleben und den Differenzierungsgrad der Chondrozyten wird von verschiedenen anderen Autoren hingewiesen (Kim et al., 2002; Yoon et al., 2002). Als Ausgangspunkt für die Inhibition dieses Signalweges ist eine stark reduzierte Interaktion zwischen Chondrozyten und ihren

spezifischen Matrixkomponenten via Integrinrezeptoren, die bekanntermaßen diesen Signalweg aktivieren, denkbar (Shakibaei et al., 2001; Goggs et al., 2003). Diese Hypothese stützen neben den eigenen Arbeiten die anderer Arbeitsgruppen, die belegen, dass eine Hemmung von  $\beta$ 1-Integrinen oder das Fehlen von knorpelspezifischen Kollagen Typ II durch Reduktion der Zell-Matrixinteraktion Apoptose in Chondrozyten induziert (Hirsh et al., 1997; Yang et al., 1997; Cao et al., 1999; Shakibaei et al., 2001).

#### **4.2 $\beta$ 1-Integrinrezeptoren in Chondrozyten**

Neben ihrer Rolle als essentielle Zell-Matrix Rezeptoren im Hinblick auf die Differenzierung von Chondrozyten sind Integrine offensichtlich in viele andere Prozesse im Knorpel involviert. Bekannt ist ihre Funktion als Mechanorezeptoren (Millward-Sadler und Salter, 2004; Chowdhury et al., 2006). Aber auch in die Regulation kataboler Prozesse im Knorpel sind sie wahrscheinlich eingebunden: Attur et al., (2000) konnten zeigen, dass  $\beta$ 1-Integrine die Expression pro-inflammatorischer Zytokine regulieren können. Im gleichen Zusammenhang muß man die Ergebnisse einer weiteren Arbeit betrachten, die belegt, dass zwischen  $\beta$ 1-Integrinen und verschiedenen MMPs (MMP-1, -3 und -9) eine Ko-Lokalisation besteht und auch entsprechend der Ergebnisse von Ko-Immünpräzipitations-Experimenten eine direkte funktionelle Interaktion vermutet werden darf (Schulze-Tanzil et al., 2001). Hier kann eine Kooperation zwischen Integrinen und MMPs in der Lenkung des Remodellings in der extrazellulären Knorpelmatrix angenommen werden. Eine solche Wechselbeziehung ist in anderen Zellsystemen bereits genauer untersucht worden (Werb et al., 1989).

Zwischen  $\beta$ 1-Integrinen und dem VEGFR3 konnte eine ähnliche regulatorische Interaktion beobachtet werden (Shakibaei et al., 2003). Die Rolle des VEGFR3 ist bislang im Knorpel noch nicht untersucht worden. Seine Nachweisbarkeit beschränkte sich jedoch auf oberflächliche Zonen arthrotisch veränderten Knorpels als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung im Entzündungsgeschehen der aktiven Arthrose. Der Rezeptor ko-lokalisierte und interagierte funktionell mit  $\beta$ 1-Integrinen und war zudem durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  reguliert, was eine Bedeutung bei katabolen Prozessen im Knorpel vermuten läßt. Ein anderer Zelloberflächen-Rezeptor, uPAR, der als Teil des Serin Proteinase Systems ebenfalls im Zusammenhang mit Gelenkentzündungen gesehen werden kann, zeigte eine Ko-Lokalisation mit MMP-9 auf der Chondrozytenoberfläche und war in gleicher Weise durch IL-1 $\beta$  reguliert (Schwab et al., 2004). Integrine sind zentrale Komponenten multifunktionaler Zell-Matrix-Adhäsionskomplexe. Neben den Integrinen umfassen diese wahrscheinlich eine Vielzahl bekannter und noch unbekannter Komponenten mit

mannigfaltigen Funktionen in der Knorpelhomöostase. Die weitere Analyse der Rolle von Integrinen im Knorpel bedarf also einer äußerst differenzierten und vielschichtigen Betrachtung.

### **4.3 Beeinflussung Zytokin-induzierter Effekte durch Phytopharmaka**

Folgende Arbeiten beschäftigten sich mit den Wirkungen klassischer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Knorpelzellen und ihrer Hemmung durch verschiedene Phytopharmaka. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induzierten typische katabole Effekte wie eine Hemmung der Kollagen Typ II Synthese, Induktion von MMPs, COX-2 und Apoptose. Diese sind auch von anderen Autoren beschrieben (Seguin und Bernier, 2003; Fan et al., 2006). Phytopharmaka wie der Brennesselblätterextrakt *Hox alpha*, der Extrakt der Afrikanischen Teufelskralle *Jucurba* und *Curcumin*, eine Komponente des indischen Curry-Gewürzes hemmten die durch Zytokine induzierten katabolen Wirkungen in Knorpelzellkulturen (Schulze-Tanzil et al., 2002a, 2004a,d; Shakibaei et al., 2005a, 2007). Ein möglicher Wirkungsmechanismus könnte u. a. auf einer Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beruhen. In der Literatur sind andere Phytopharmaka beschrieben, die vergleichbar entzündungshemmende Effekte in Knorpelzellkulturen aufweisen (Ahmed et al., 2002; Garbacki et al., 2002; Singh et al., 2002, 2003). Weitere Mechanismen dieser natürlichen Wirkstoffe, die im Rahmen dieser Studien noch nicht untersucht wurden, müssen vermutet werden. So gibt es Hinweise, dass *Curcumin* auch die Komplementaktivität in anderen Geweben inhibiert (Kulkarni et al., 2005). Eine Rolle des Komplementsystems im Hinblick auf die Genese von post-traumatischen Gelenkentzündungen und daraus entstehender sekundärer Arthrose bleibt dabei noch völlig unklar, und wird in einer eigenen Übersichtsarbeit diskutiert. Da dieses katabole System eine große Bedeutung bei traumatischen Schädigungen anderer Gewebe (z. B. Schädel-Hirntrauma, Bellander et al., 2001) hat und seine Aktivität durch die klassischen pro-inflammatorischen Zytokine, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , reguliert wird, erscheint ein Zusammenhang wahrscheinlich (John et al., 2007b). Deshalb ist die Komplementaktivität im Knorpel sowie ihre Wechselbeziehung zu Zytokinen Gegenstand gegenwärtiger Experimente, um zu beurteilen, ob eine Komplementinhibition potentiell interessant als therapeutischer Ansatzpunkt für die Therapie von Gelenkentzündungen sein könnte. Auch immunregulatorische Zytokine wie IL-10 könnten als indirekt anabol fungierende Mittler bei Gelenkentzündungen eine Therapiestrategie beeinhalten.

#### 4.4 Wirkung von IL-10 in Knorpelzellen

In Übereinstimmung mit den Angaben von Iannone et al., (2001) konnte *in vitro* und *in situ* gezeigt werden, dass IL-10 in Chondrozyten auf RNA und Protein Ebene exprimiert ist (Müller et al., 2008b). Darüber hinaus wurde der spezifische Rezeptor für IL-10, der IL-10R1, als Indiz für eine Sensibilität der Chondrozyten gegenüber diesem Zytokin nachgewiesen. Der IL-10R2 war ebenso in Chondrozyten exprimiert, was allerdings nicht überraschte, da er ubiquitär exprimiert ist und auch für die Signalübertragung anderer Zytokine der IL-10 Interferon Familie wie IL-22, IL-26, IL-28 und IL-29 die Voraussetzung darstellt. Desweiteren wurde die Expression weiterer Rezeptoren für Zytokine der IL-10 Familie in Chondrozyten dargestellt und der Expression in Immunzellen gegenübergestellt (Wolk et al., 2008). Sowohl der IL-10R1 wie auch IL-10 wurden durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Knorpelzellen hochreguliert, ein Hinweis auf eine mögliche Rolle dieses Zytokins im Knorpel unter Entzündungsbedingungen. Dieses steht in Übereinstimmung mit Angaben von Iannone et al., (2001) und Fernandes et al., (2002), die berichten, dass IL-10 in höherer Konzentration im arthrotischen Knorpel nachweisbar ist, wo eine Präsenz eben dieser pro-inflammatorischen Zytokine anzunehmen ist.

Experimente anderer Untersucher mit IL-10 im Tiermodell lassen schließen, dass IL-10 eine chondroprotektive Potenz im entzündeten Gelenk entfalten kann (Joosten et al., 1997; Jorgenson et al., 1999; Lechman et al., 1999, 2003; Neumann et al., 2002; Van de Loo und Van den Berg, 2002; Kuroda et al., 2006; Trachsel et al., 2007). Die direkte Wirkung von IL-10 auf Knorpelzellen fand bisher kaum Beachtung und wurde in wenigen vorhandenen Untersuchungen widersprüchlich bewertet (Van Roon et al., 1996; Wang und Lou, 2001; Radons et al., 2006). Ein erfolgreicher Gentransfer eines IL-10 Gens und damit eine IL-10 Überexpression in Chondrozyten ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Somit bleibt die Frage unbeantwortet, ob ein *ex vivo* Gentransfer eines IL-10 Gens in Chondrozyten und anschließende Transplantation IL-10 überexprimierender Chondrozyten in einen Knorpeldefekt ein sinnvoller Ansatzpunkt zur Hemmung der Entstehung einer post-traumatischen Arthrose darstellt. Mit Hilfe einer IL-10 Überexpression, bei der sehr hohe Konzentrationen von IL-10 auf die Chondrozyten einwirken, wurden die Effekte von IL-10 im Vergleich zur Stimulation mit geringeren Konzentrationen an rekombinanten IL-10 (10 ng/mL) in Knorpelzellen *in vitro* genauer untersucht. Essentielle Charakteristika der Knorpelhomöostase wie Matrixsynthese, -degradation und Chondrozytenapoptose fanden dabei besondere Berücksichtigung. In verschiedenen Zelltypen ist bekannt, dass IL-10 einen regulatorischen Einfluss auf das Zellüberleben nimmt (Weber-Nordt et al., 1996; Rojas et al.,

1999; Zhou et al., 2001). Hierzu werden allerdings nicht ausschließlich anti-apoptotische Wirkungen mitgeteilt, sondern es finden sich auch Berichte für pro-apoptotische Wirkungen, die v. a. Immunzellen betreffen. Die Experimente in Chondrozyten ergaben, dass IL-10 pro-apoptotische Wirkungen von TNF $\alpha$  beeinflusste: durch TNF $\alpha$  induzierte Aktivitäten der Effektor-Caspasen-3/-7 konnten durch IL-10 vermindert werden. Auch das durch TNF $\alpha$  induzierte ungünstige Bax/Bcl-2 Verhältnis verringerte sich unter dem Einfluss von IL-10 - als Hinweis auf die Modulation intrinsischer Apoptosewege durch IL-10 (John et al., 2007b). Insbesondere intrinsische Apoptosewege haben in der Arthroseentstehung eine wesentliche Bedeutung (Blanco et al., 2004; Huser et al., 2006). In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise auf einen Antagonismus zwischen IL-10 und TNF $\alpha$  in anderen Zelltypen, der über eine STAT-3 Aktivierung und Zytokininhibitoren wie dem Suppressor Of Cytokine Signalling (SOCS)-3 vermittelt werden kann (Qing et al., 2003; Qasimi et al., 2006). Eine anti-apoptotische Wirkung und ein Antagonismus zwischen dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  und IL-10 konnte bereits von Wang und Lou (2001) in Chondrozyten dargestellt werden.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass IL-10 im Knorpel definierte Wirkungen hat: die Kollagen Typ II mRNA Expression der Chondrozyten wurde sowohl durch geringe (10 ng/mL rekombinantes IL-10) als auch hohe IL-10 Konzentrationen (IL-10 Überexpression) signifikant hochreguliert (John et al., 2007b; Müller et al., 2008b). Eine direkte Auswirkung von IL-10 auf die Aggrecan Expression in kultivierten Chondrozyten konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine modulatorische Wirkung von IL-10 auf die Expression von extrazellulären Matrixproteinen in anderen Bindegewebszellen ist bereits für Fibroblasten beschrieben worden (Reitamo et al., 1994; Yamamoto et al., 2001; Moroguchi et al., 2004). Hier werden sowohl anabole wie auch katabole Einflüsse von IL-10 dargestellt. Die Autoren berichten von einer Herabregulierung von Kollagen Typ I in Fibroblasten bei gleichzeitiger Induktion verschiedener MMPs. Yamamoto et al., (2001) stellt eine Stimulation der Decorin Expression dar und Reitamo et al., (1994) beschreibt zudem eine Zunahme der Elastin Expression unter dem Einfluss von IL-10 in Bindegewebszellen. Wurden Chondrozyten mit einer Kombination von TNF $\alpha$  und IL-10 behandelt, um die Präsenz entzündlicher Zytokine bei einer post-traumatischen Gelenkentzündung zu imitieren, zeichnete sich ein Antagonismus zwischen beiden Zytokinen ab: die durch TNF $\alpha$  induzierte Hemmung der Aggrecan Expression konnte signifikant inhibiert werden, für die MMP-13 Expression deutete sich eine sinkende Tendenz sowohl bei Experimenten mit dem IL-10 Vektor wie auch mit rekombinanten IL-10 an.

IL-10 beeinflusste sowohl die Genexpression knorpelspezifischer Proteine der extrazellulären Matrix und modifizierte die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  auf diese, des weiteren scheint es auch die Expression von bestimmten Matrix-abbauenden Enzymen im Zusammenspiel mit  $\text{TNF}\alpha$  zu regulieren, so dass ein anti-kataboler Nettoeffekt vermutet werden kann.

Die vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen ist ein Zeichen für die Aktivierung von Knorpelzellen bei einer Gelenkentzündung und unterhält den Entzündungsprozess weiter.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 spielen im Entzündungsgeschehen der Arthrosepathogenese eine wichtige Rolle (Malemud et al., 2003). In anderen Zelltypen ist für IL-10 eine anti-inflammatorische Wirkung mit Hemmung der Expression dieser Zytokine bekannt (Katsikis et al., 1994). Die starke Induktion pro-inflammatorischer Zytokine (wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) durch  $\text{TNF}\alpha$  wurde durch rekombinantes IL-10 nur im Falle von IL-1 $\beta$  in den Chondrozyten beeinflusst. Hohe IL-10 Konzentrationen, die durch eine IL-10 Überexpression erreicht werden, modifizierten tendenziell die durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierte Expression von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 $\beta$ , nicht aber die IL-6 Expression. Die Hemmung der IL-6 Expression durch IL-10 konnte in Makrophagen beobachtet werden (Driessler et al., 2004), scheint aber in Chondrozyten keine Bedeutung zu haben. Auch in Chondrozyten zeichnen sich für IL-10 anti-inflammatorische Wirkungen ab, die allerdings sowohl Zytokin- wie auch Konzentrations-abhängig sind.

Um einen gentherapeutischen Einsatz eines adenoviralen Vektors zu rechtfertigen, ist eine Langzeitexpression des Transgens wünschenswert. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Expression mit dem EGFP und dem IL-10 Vektor über mehrere Wochen durchgeführt. Nach Vorexperimenten in der Monolayerkultur wurden hierfür zwei Systeme von 3D Kulturen (Alginat- und Massenkultur) verwendet. In den 3D Kulturen konnte eine Transgenexpression über mehrere Wochen nachgewiesen werden (Müller et al., 2008a). Diese teilweise sehr hohen Konzentrationen an IL-10 in IL-10 transduzierten Chondrozyten haben keine Veränderungen der Chondrozytenmorphologie oder suppressive Wirkung auf die Expression spezifischer und unspezifischer Knorpelmatrixproteine, wie in 3D Knorpelzell-Kulturen gezeigt werden konnte, zur Folge (Müller et al., 2008a,b).

## **5 Ausblick**

Die Forschungsarbeit der letzten Jahrzehnte hat noch keine nennenswerte Innovation der Arthrose-Therapie herbeigeführt. Die Arthrose bleibt eine unheilbare Erkrankung, die weltweit neben dem Leidensdruck der Patienten einen erheblichen ökonomischen

Kostendruck verursacht (Wilson et al., 1990). Vor allem bei jungen Patienten hat die Entstehung einer post-traumatischen Arthrose nach einem Gelenktrauma eine äußerst ungünstige Langzeit-Prognose für die Gelenkfunktion, Mobilität und damit Lebensqualität des Patienten.

In der vorliegenden Arbeit konnten Aspekte zur Wirkung von Phytopharmaka, die unterstützend in der Arthrosetherapie eingesetzt werden könnten sowie der möglichen Bedeutung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Knorpelzellen und einer denkbaren Nutzbarkeit als chondroprotektive Therapiestrategie im Hinblick auf die post-traumatische Arthrose diskutiert werden. Außerdem wurde die Frage der Dedifferenzierung von Knorpelzellen in der Kultur bearbeitet, die von großer Bedeutung im Hinblick auf Knorpelzelltransplantationen ist. Dabei wurden für IL-10 in Knorpelzellen anabole aber auch leicht immunstimulatorische und im Zusammenwirken mit TNF $\alpha$  anti-katabole und anti-apoptotische Eigenschaften nachgewiesen. Die Übertragbarkeit dieser *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse kann zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr vorsichtig vermutet werden:

Das Gelenk stellt eine dynamische Funktionseinheit dar, in der neben den Chondrozyten viele weitere Zelltypen der Synovialmembran und des subchondralen Knochens sowie einwandernde Entzündungszellen in den Entzündungsprozess einer sich entwickelnden post-traumatischen Arthrose intensiv eingebunden sind, aktiv reagieren und sich gegenseitig beeinflussen. Diese Zusammenhänge könnten nur in einem geeigneten Tiermodell ausreichend Berücksichtigung finden. Im Verlauf dieser Arbeit haben sich darüber hinaus verschiedene weiterführende Fragestellungen entwickelt, die sich auf die Bedeutung anderer noch unbekannter Vertreter der IL-10 Familie im Knorpel beziehen und mit deren potentieller inflammatorischer oder anti-inflammatorischer Bedeutung bei Gelenkentzündungen beschäftigen sowie die Bedeutung anderer essentieller kataboler Systeme beziehen.

## 6 Zusammenfassung

Mit der Charakterisierung des Redifferenzierungsverhaltens dedifferenzierter Chondrozyten in 3D Kultursystemen konnte gezeigt werden, dass bei menschlichen Chondrozyten nach der 4. Passage in der Monolayerkultur eine irreversible Dedifferenzierung eintritt. Diese Zellen sind damit für die Verwendung als Basis für autologe Knorpelzelltransplantationen unbrauchbar, denn sie synthetisieren keine belastbare Knorpelmatrix mehr. Der Verlust des chondrogenen Potentials ging offensichtlich mit einer Hemmung der Interaktion von Signalproteinen des MAPKinase Signalweges einher. Durch eine Inhibition dieses essentiellen Signalweges kann in Chondrozyten direkt Apoptose induziert werden. Die Analyse spezifischer Integrinfunktionen zeigte, dass  $\beta$ 1-Integrine auf der Zelloberfläche von Chondrozyten mit weiteren Rezeptorkomplexen, die z. T. katabolen Systemen zuzuordnen sind, kooperieren, als Hinweis auf ihren multifunktionellen Charakter. Die Wirkungen pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Knorpelzellkulturen beinhalteten eine Hemmung der Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine, die Induktion von katabolen und inflammatorischen Enzymen (MMPs und COX-2), und die Einleitung einer Apoptose, erkennbar an typischen morphologischen Kennzeichen und einer vermehrten Caspase-3 Aktivität. Hierbei wurde deutlich, dass verschiedene Phytopharmaka die katabolen Zytokinwirkungen im Knorpel partiell inhibieren konnten und damit als Ergänzung für die Arthrosetherapie interessant sind. Als möglicher protektiver Wirkungsmechanismus wurde für *Curcumin* eine NF- $\kappa$ B Hemmung auf verschiedenen Ebenen diskutiert. Im Folgenden wurde die Idee einer lokalen Entzündungs-Hemmung durch anti-inflammatorische Zytokine im Knorpel verfolgt. Die Untersuchungen der direkten Wirkungen von rekombinanten IL-10 auf Knorpelzellen ergaben eine Hemmung TNF $\alpha$  induzierter pro-apoptotischer Wirkungen über die Beeinflussung intrinsischer Apoptosewege und eine Stimulation der Kollagen Typ II mRNA Expression durch IL-10. Eine Entzündungshemmung über die Suppression der Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch IL-10 wie für andere Zelltypen beschrieben, deutete sich nur für IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  an. Experimente mit dem IL-10 Überexpressionsvektor führten zu einem effektiven Überexpressionsmodell für IL-10 in Knorpelzellen, in dem die in Experimenten mit rekombinanten IL-10 erzielten Ergebnisse weitgehend Bestätigung fanden und keine Minderung des differenzierten chondrozytären Phänotyps erkennbar war.

## 7 Literaturübersicht

- Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM (2002). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 33: 1097-105.
- Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H (2005). The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci* 77: 3210-21.
- Aigner T, Stoeve J (2003). Collagens – major components of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery reviews* 55: 1569-93.
- Archer CW, West PF (2003). Cells in focus: The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 401-404.
- Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR (2000). Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J Immunol* 164: 2684-91.
- Benya PD, Shaffer JD (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215-24.
- Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M (2001). Complement activation in human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma* 18: 1295-311.
- Billinghurst RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, van Wart H, Poole AR (2000). Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum* 43: 664-72.
- Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E (2004). Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 4: 715-28.
- Blanco GFJ (1999). Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 308-9.
- Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger C (1994). Re-expression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 212: 97-104.
- Borrelli J (2006). Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis. *J Orthop Trauma* 20: 726-731.
- Borrelli J, Ricci WM (2004). Acute effects of cartilage impact. *Clin Orthop Relat Res* 423: 33-9.
- Bouton LA, Ramirez CD, Bailey DP, Yeatman CF, Yue J, Wright HV, Domen J, Rosato RR, Grant S, Fischer-Stenger K, Ryan JJ (2004). Co-stimulation with interleukin-4 and interleukin-10 induces mast cell apoptosis and cell-cycle arrest: the role of p53 and the mitochondrion. *Exp Hematol* 32:1137-45.
- Brittberg M (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 367 Suppl: S147-55.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-95.
- Buckwalter JA (2002). Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res* 402: 21-37.
- Buckwalter JA, Brown TD (2004). Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 423: 7-16.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 11: 529-43.
- Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W, Yang BB (1999). beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol* 18: 343-55.

- Cawston TE, Ellis AJ, Bigg H, Curry V, Lean E, Ward D (1996). Interleukin-4 blocks the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage treated with cytokines. *Biochim Biophys Acta*:1314: 226-32.
- Chappell VL, Le LX, LaGrone L, Mileski WJ (2000). Stat proteins play a role in tumor necrosis factor alpha gene expression. *Shock* 14: 400-2; discussion 402-3.
- Chikanza I, Fernandes L (2000). Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1499-510.
- Cho TJ, Lehmann W, Edgar C, Sadeghi C, Hou A, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2003). 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* 48: 2845-54.
- Chowdhury TT, Appleby RN, Salter DM, Bader DA, Lee DA (2006). Integrin-mediated mechanotransduction in IL-1 beta stimulated chondrocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 5: 192-201.
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16.
- Cucchiari M, Madry H (2005). Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7(12): 1495-509.
- Cucchiari M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF (2005). Improved tissue repair in articular cartilage defects *in vivo* by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* 12: 229-38.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, De Maio M, Caputi AP (2001). Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of murine type-II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw* 12: 568-80.
- Darling EM, Athanasiou KA (2005). Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23: 425-32.
- Donnelly RP, Sheikh F, Kotenko SV, Dickensheets H (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol* 76: 314-21.
- Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ (2004). Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135: 64-73.
- Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C (2007). Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials* 28: 5570-80.
- Fan Z, Yang H, Bau B, Söder S, Aigner T (2006). Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int* 26: 900-3.
- Fajardo M, Di Cesare PE (2005). Disease-modifying therapies for osteoarthritis: current status. *Drugs Aging* 22: 141-61.
- Feng L, Balakir R, Precht P, Horton WE (1999). Bcl-2 regulates chondrocyte morphology and aggrecan gene expression independent of caspase-activation and full apoptosis. *J Cell Biochem* 74: 576-86.
- Feng L, Precht P, Balakir R, Horton WE (1998). Evidence of a direct role for bcl-2 in the regulation of articular chondrocyte apoptosis under the conditions of serum withdrawal and retinoic acid treatment. *J Cell Biochem* 71: 302-9.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39: 237-46.
- Fernández P, Guillén MI, Gomar F, Alcaraz MJ (2003). Expression of heme oxygenase-1 and regulation by cytokines in human osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 15; 66: 2049-52.
- Finnegan A, Kaplan CD, Cao Y, Eibel H, Glant TT, Zhang J (2003). Collagen-induced arthritis is exacerbated in IL-10-deficient mice. *Arthritis Res Ther* 5: R18-24.

- Flannery CR, Hughes CE, Schumacher BL, Tudor D, Aydelotte MB, Kuettner KE, Caterson B (1999). Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 535-41.
- Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF Jr (2005). Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1118-24.
- Garbacki N, Angenot L, Bassleer C, Damas J, Tits M (2002). Effects of prodelphinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 365: 434-41.
- Garg AK, Aggarwal BB (2002). Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* 39: 509-17.
- Ge Z, Hu Y, Heng B, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, Cao T (2006). Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* 55: 493-500.
- Gelse K, Schneider H (2006). Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 259-284.
- Gelse K, von der Mark H, Schneider H (2003). Cartilage regeneration by gene therapy. *Curr Gene Ther* 3: 305-17.
- Giancotti FG (2000). Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* 2: E13-4.
- Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hörmann K, Riedel F (2006). *In vitro* analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *Int J Mol Med* 17: 301-7.
- Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Verse T, Baisch A, Hörmann K, Riedel F (2005). Differential modulation of integrin expression in chondrocytes during expansion for tissue engineering. *In Vivo* 19: 501-7.
- Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasheri A (2003). Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J* 166: 140-58.
- Haisch A, Marzahn U, Mobasheri A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M (2006). Development and phenotypic characterization of a high-density *in vitro* model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery. *Histol Histopathol* 21: 467-476.
- Haisch A., Loch A, David J, Pruss A, Hansen R, Sittinger M (2000). Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Med Biol Eng Comput* 38: 686-9.
- Haura EB, Turkson J, Jove R (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 315-24.
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok S, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ-M (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 107: 17-27.
- Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ (1996). Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am J Physiol* 271: C742-52.
- Hedbom E, Häuselmann HJ (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 59: 45-53.
- Heyninck K, Beyaert R (2001). Crosstalk between NF- $\kappa$ B-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex. *Mol Cell Biol Res Comm* 4: 259-65.
- Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V, Svoboda KK (1997). Chondrocyte survival and differentiation *in situ* are integrin mediated. *Dev Dyn* 210: 249-63.
- Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino D, Dang MN, Viera D, De Vries P, Spits H, Mosmann TR, Moore KW (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250(4982): 830-32.

- Huser CA, Peacock M, Davies ME (2006). Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1002-10.
- Hughes LC, Archer CW, Gwynn I (2005). The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mat* 9: 68-84.
- Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Cantatore FP, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G (2001). Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 19: 139-45.
- John T, Müller RD, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, Hostmann A, Tschöeke SK, Schulze-Tanzil G (2007b). Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- $\alpha$  in human articular chondrocytes *in-vitro*. *Cytokine*, 40(3): 226-34.
- John T, Stahel PF, Morgan SJ, Schulze-Tanzil G (2007a). Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and cartilage degradation. *Histol Histopathol* 22: 781-90.
- Joosten LA, Lubberts E, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ, Goldman M, van den Berg WB (1997). Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 40: 249-60.
- Jorgensen C, Apparailly F, Canovas F, Verwaerde C, Auriault C, Jacquet C, Sany J (1999). Systemic viral interleukin-10 gene delivery prevents cartilage invasion by human rheumatoid synovial tissue engrafted in SCID mice. *Arthritis Rheum* 42: 678-85.
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M (1994). Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179: 1517-27.
- Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS (2002). Erk-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem* 277: 1332-9.
- Knudson W, Loeser RF (2002). CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 59: 36-44.
- Kulkarni AP, Ghebremariam YT, Kotwal GJ (2005). Curcumin inhibits the classical and the alternative pathways of complement activation. *Ann N Y Acad Sci* 1056: 100-12.
- Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS (2006). Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 18: 64-73.
- Kuroda T, Maruyama H, Shimotori M, Higuchi N, Kameda S, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F (2006). Effects of viral interleukin-10 introduced by *in vivo* electroporation on arthrogen-induced arthritis in mice. *J Rheumatol* 33: 455-62.
- Lechman ER, Jaffurs D, Ghivizzani SC, Gambotto A, Kovesdi I, Mi Z, Evans CH, Robbins PD (1999). 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* 163: 2202-8.
- Lechman ER, Keravala A, Nash J, Kim SH, Mi Z, Robbins PD (2003). The contralateral effect conferred by intra-articular adenovirus-mediated gene transfer of viral IL-10 is specific to the immunizing antigen. *Gene Ther* 10: 2029-35.
- Legendre F, Dudhia J, Pujol JP, Bogdanowicz P (2003). JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem* 278: 2903-12.
- Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998). Dedifferentiated Chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 176: 303-13.

- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M (2003). 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* 288: 208-17.
- Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH (2006). The chondrocyte: Biology and clinical application. *Tissue Eng* 12: 1971-84.
- Loeser RF (2000). Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 37: 109-16.
- Loeser RF (2002). Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology* 39: 119-24.
- Lubberts E, Joosten LAB, van den Bersselaar L, Helsen MMA, Bakker AC, Xing Z, Richards CD, van den Berg WB (2000). Intra-articular IL-10 gene transfer regulates the expression of collagen-induced arthritis (CIA) in the knee and ipsilateral paw. *Clin Exp Immunol* 120: 375-83.
- Madry H, Cucchiari M, Kaul G, Kohn D, Terwilliger EF, Trippel SB (2004). Menisci are efficiently transduced by recombinant adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*. *Am J Sports Med* 32: 1860-5.
- Madry H, Cucchiari M, Terwilliger EF, Trippel SB (2003). Recombinant Adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 14: 393-402.
- Madry H, Kaul G, Cucchiari M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2005). Enhanced repair of articular cartilage defects *in vivo* by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 15: 1171-9.
- Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM (2003). Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs* 174: 34-48.
- Mannello F, Gazzanelli G (2001). Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 6: 479-82.
- Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE (1999). Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor-2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res* 253: 681-8.
- Martin JA, Buckwalter JA (2006). Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage. *Biorheology* 43: 517-21.
- Martinek V (2003). Anatomy and pathophysiology of hyaline cartilage. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54: 166-70.
- Metters AT, Anseth KS, Bowman CN (1999). Fundamental studies of biodegradable hydrogels as cartilage replacement materials. *Biomed Sci Instrum* 35: 33-8.
- Millward-Sadler SJ, Salter DM (2004). Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 32: 435-46.
- Minich DM, Bland JS, Katke J, Darland G, Hall A, Lerman RH, Lamb J, Carroll B, Tripp M (2007). Clinical safety and efficacy of NG440: a novel combination of rho iso-alpha acids from hops, rosemary, and oleanolic acid for inflammatory conditions. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 872-83.
- Moos V, Fickert S, Müller B, Weber U, Sieper J (1999). Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol* 26: 870-9.
- Moroguchi A, Ishimura K, Okano K, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H (2004). Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts. *Eur Surg Res* 36: 39-44.
- Müller RD, John T, Kohl B, Feldner A, Zreiqat H, Ertel W, LaFace D, Hutchins B, Oberholzer A, Schulze-Tanzil G (2008a). Cartilage-specific matrix and integrin expression in three-dimensional articular chondrocyte cultures overexpressing human interleukin-10. *Clinical Medicine: Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 1: 21-32.
- Müller RD, John T, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, Hellmuth M, LaFace D, Hutchins B, Laube G, Veh R, Tschöcke SK, Schulze-Tanzil G. IL-10 overexpression differentially

- affects cartilage matrix gene expression in response to TNF $\alpha$  in human articular chondrocytes *in vitro*. In press 2008b: *Cytokine*
- Murata M, Yudoh K, Masuko K (2008). The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage*: 16: 279-86.
- Nesic D Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P (2006). Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 300-22.
- Neumann E, Judex M, Kullmann F, Grifka J, Robbins PD, Pap T, Gay RE, Evans CH, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U (2002). Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther* 9: 1508-19.
- Oberholzer A, John T, Kohl B, Gust T, Muller RD, La Face D, Hutchins B, Zreiqat H, Ertel W, Schulze-Tanzil G (2007). Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res* 328: 383-90.
- Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, Minter RM, Tannahill CL, Abouhamze A, LaFace D, Hutchins B, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL (2001). Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11503-8.
- Ouyang P, Meng SR, Liu YB, Xu DL, Lai WY, Peng LS, Xu AL (2004). [Effects of recombinant human interleukin-10 on tumor necrosis factor-alpha-induced adventitial fibroblast proliferation in vitro] *Di Yi Yun Yi Da Xue Xue Bao* 24: 50-2.
- Poole AR (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191: 1-13.
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S (2001). Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 391: 26-33.
- Qasimi P, Ming-Lum A, Ghanipour A, Ong CJ, Cox ME, Ihle J, Cacalano N, Yoshimura A, Mui ALF (2006). Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$  and nitric oxide production by macrophages. *J Biol Chem* 281: 6316-24.
- Qing M, Nimmegern A, Heinrich PC, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, Hess J, von Bernuth G, Seghaye MC (2003). 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* 31: 2769-75.
- Radons J, Falk W, Schubert TE (2006). Interleukin-10 does not affect IL-1-induced interleukin-6 and metalloproteinase production in human chondrosarcoma cells, SW1353. *Int J Mol Med* 17: 377-83.
- Rath PC, Aggarwal BB (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350-64.
- Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J (1994). Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 94: 2489-92.
- Rojas M, Oliver M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF (1999). TNF-alpha and IL-10 modulates the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *J Immunol* 162: 6122-31.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Schlegel J (2002). Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 62-70.
- Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS (2003). Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 681-7.
- Schulze M, Kuettner KE, Cole A (2000). Human adult articular chondrocytes cultured in alginate beads maintain their phenotype in preparation for transplantation. *Orthopäde* 29: 100-6.

- Schulze-Tanzil G, de Souza P, Behnke B, Klingelhofer S, Scheid A, Shakibaei M (2002a). Effects of the antirheumatic remedy Hox alpha- a new stinging nettle leaf extract- on matrix metalloproteinases in human chondrocytes *in vitro*. *Histol Histopathol* 17: 472-85.
- Schulze-Tanzil G, de Souza P, Merker H-J, Shakibaei M (2001). Co-localization of integrins and matrix metalloproteinases in the extracellular matrix of chondrocyte cultures. *Histol Histopathol* 16: 1081-9.
- Schulze-Tanzil G, Hansen C, Shakibaei M (2004a). Wirkung des Extraktes *Harpagophytum procumbens* DC auf Matrix Metalloproteinasen in menschlichen Knorpelzellen *in vitro*. *Arzneimittelforschung* 54: 213-20.
- Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker H-J, Scheid A, Shakibaei M (2002b). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 308: 371-9.
- Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, de Souza P, John T, Shakibaei M (2004c). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient SHC-ERK interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 448-58.
- Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Sendzik J, John T, Shakibaei M (2004d). Effects of curcumin (Diferuloylmethane) on Nuclear Factor-(kappa)B signalling in interleukin-1(beta)-stimulated chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1030: 578-86.
- Schulze-Tanzil G, Müller RD, Kohl B, Schneider N, Ertel W, Stark R, Ipaktchi K, John T (2008). Differing *in vitro* Biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: An immunomorphological study. *Histochem Cell Biol (in press)*.
- Schwab W, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Dressler J, Kotsch M, Shakibaei M (2004). Interleukin-1 $\beta$ -induced expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 19: 105-112.
- Seguin CA, Bernier SM (2003). TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Physiol* 197: 356-69.
- Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehman I, Mobasheri M (2007). Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 73: 1434-45.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ (2001). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 276: 13289-94.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasheri A (2005a). Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 $\beta$ -induced inhibition of collagen type II and  $\beta$ 1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study. *Ann Anat* 187: 487-97.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Beichler T, Dressler J, Schwab W (2003). Expression of the VEGF receptor-3 in osteoarthritic chondrocytes: stimulation by interleukin-1 $\beta$  and association with  $\beta$ 1-integrins. *Histochem Cell Biol* 120: 235-41.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB (2005b). Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid Redox Signal* 7: 482-96.
- Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM (2002). Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum* 46: 2079-86.
- Singh R, Ahmed S, Malemud CJ, Goldberg VM, Haqqi TM (2003). Epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced activation of mitogen activated protein kinase subgroup c-Jun N-terminal kinase in human osteoarthritis chondrocytes. *J Orthop Res* 21: 102-9.

- Stephanou A, Latchman DS (2005). Opposing actions of STAT-1 und STAT-3. *Growth Factors* 23: 177-82.
- Stockwell RA (1978). Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 12: 7-13.
- Tanabe BK, Abe LM, Kimura LH, Reinker KA, Yamaga KM (1996). Cytokine mRNA repertoire of articular chondrocytes from arthritic patients, infants, and neonatal mice. *Rheumatol Int* 16: 67-76.
- Trachsel E, Bootz F, Silacci M, Kaspar M, Kosmehl H, Neri D (2007). Antibody-mediated delivery of interleukin-10 inhibits the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 9: R9.
- Van de Loo FA, van den Berg WB (2002). Gene therapy for rheumatoid arthritis. Lessons from animal models, including studies on interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist as potential disease modulators. *Rheum Dis Clin North Am* 28: 127-49.
- Van Roon JA, Van Roy JL, Gmelig-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW (1996). Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum* 39: 829-35.
- Vrahas MS, Mithoefer K, Joseph D (2004). The longterm effects of articular impaction. *Clin Orthop Rel Res* 423: 40-43.
- Wang Y, Lou S (2001). Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. *Chin Med J (Engl)* 114: 723-5.
- Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D, Mertelsmann R, Finke J (1996). Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD 34+hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88: 2549-58.
- Wehling P, Moser C, Fisbie D, McIlwraith CW, Kawcak CE, Krauspe R, Reinecke JA (2007). Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy. *BioDrugs* 21: 323-32.
- Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin expression. *J Cell Biol* 109: 877-89.
- Wilson MG, Mitchet CJ Jr, Ilstrup DM, Melton LJ (1990). Idiopathic symptomatic osteoarthritis of the hip and knee: a population-based incidence study. *Mayo Clin Proc* 65: 1214-21.
- Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, John T, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Sabat R (2008). Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* 83: 1181-93.
- Yagi R, McBurney, Horton WE (2005). Bcl-2 positively regulates Sox9-dependent chondrocyte gene expression by suppressing the MEK-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem* 280: 30517-25.
- Yamamoto T, Eckes B, Krieg T (2001). 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* 281: 200-5.
- Yang C, Li C-W, Helminen HJ, Khillan JS, Bao Y, Prockop DJ (1997). Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II. *Exp Cell Res* 235: 370-3.
- Yasuda T (2006). Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 16: 197-205.
- Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo YJ, Huh TL, Chun JS (2002). Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 8412-20.
- Zdanov A (2004). Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Curr Pharm Des* 10: 3873-84.
- Zhang X, Mao Z, Yu C (2004). Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10. *J Orthop Res* 22: 742-50.

Zhou JH, Broussard SR, Strle K, Freund GG, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW (2001). IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'kinase. *J Immunol* 167: 4436-42.

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch für seine großzügige Unterstützung, die Betreuung dieser Habilitationsarbeit und damit die Möglichkeit im Fach *Anatomie* habilitieren zu können.

Gleichzeitig richtet sich mein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Ertel für die unkomplizierte Aufnahme in seine unfallchirurgische Forschungs-Abteilung, das Vertrauen, die Zuverfügungstellung seines Forschungslabors für die Durchführung der Experimente sowie seine stete Unterstützung, die die absolute Basis für Entstehen und Abschluss dieser Arbeit war. Der wesentliche Teil dieser Habilitationsarbeit wurde in seinem Labor durchgeführt.

Mein ganz persönlicher Dank ist für Herrn Dr. Thilo John bestimmt, der in langjähriger Zusammenarbeit und Freundschaft stets Rat, Tat, Enthusiasmus und immer sehr entscheidene Hilfe und Unterstützung beigesteuert hat.

Danken möchte ich vor allem auch meiner Doktorandin Frau Riccarda Müller und Herrn Benjamin Kohl, die sich von vielen Schwierigkeiten nicht haben entmutigen lassen. Beiden danke ich für ihre vielen guten Ideen, von denen die Arbeitsgruppe stets enorm profitiert hat.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Marion Lemke, Frau Claudia Conrad sowie auch bei allen Diplomanden (Anja Feldner, Dörte Lodka, Annekatriin Aue, Christian Rosen, Danim Shin) und Praktikanten (Caroline Tientcheu, Selina Esche, Navid Dedashthi), die in der Arbeitsgruppe fleißig mitgeholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt mehreren Kooperationspartnern: Frau Dr. Hala Zreiqat für ihre langjährige Freundschaft sowie stets kostbaren Rat, Hilfe und ihre Zusammenarbeit, Herrn Dr. Robert Sabat, der entscheidendes Know How und Ideen zur IL-10 Familie zur Verfügung gestellt hat, sowie Herrn Dr. PD Andreas Oberholzer, der mich in der Startphase des IL-10 Projektes ganz erheblich unterstützt hat und sehr wichtige Grundsteine und Diskussionen zu diesen Abschnitt der Arbeit beigetragen hat. Desweiteren danke ich Herrn PD Dr. Philip Stahel für weitere Ideen, Rat und Unterstützung.

Herrn Dr. Andreas Winkelmann danke ich besonders für die große Kooperationsbereitschaft und stets unkomplizierte Unterstützung bei allen Fragen im Anatomie-Unterricht.

Für die Unterstützung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen danke ich Herrn Prof. Dr. Rüdiger Veh, Herrn Dr. Gregor Laube, und Frau Petra Loge.

Frau Prof. Dr. Petra Köpf-Maier sowie weiteren Kollegen im ehemaligen „Dahlemer Lehrteam“ verdanke ich den wesentlichen Teil meiner Anatomischen Ausbildung. Hinsichtlich der folgenden Jahre bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gottfried Bogusch für seine wertvolle fachliche Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen netten ehemaligen Kollegen aus der „Dahlemer Zeit“: Frau Dr. Judith Sendzik, Frau Dr. Agnes Ellinghaus, Frau Angelika Hartje, Frau Angelika Steuer und Herrn Dr. Phillippe de Souza für ihre enorme Kollegialität und Freundschaft, die mir stets eine sehr große Hilfe war – wir haben uns immer gut verstanden und wir stehen alle noch immer in freundschaftlichem Kontakt.

Desweiteren möchte ich mich bedanken bei zahlreichen ehemaligen Kollegen aus der unfallchirurgischen Forschungsabteilung für viele fruchtbare Diskussionen und Anregungen: Herrn Dr. Arwed Hostmann, Frau Birgit Vogt, Herr Dr. Markus Hellmuth, Frau Dr. Tatjana Gust.

Herrn Prof. Dr. M. Shakibaei verdanke ich die Zusammenarbeit während meiner Assistentenzeit.

Ohne die Unterstützung durch ein Rahel-Hirsch Stipendium der Charité wäre diese Habilitationsarbeit nicht möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich und meine Pläne in jeder Situation kompromislos unterstützt hat.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité

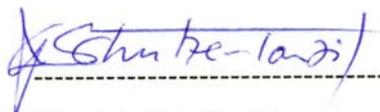
Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Berlin, den 27.10.08



Gundula Schulze-Tanzil