

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wachstumsfaktor-induzierte Stabilisierung des chondrogenen  
Potentials der humanen Chondrozyten *in vitro*:  
(Mögliche Anwendung für das Tissue-Engineering)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Seifarth

aus Apolda

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Shakibaei  
2. Prof. Dr. R. Stahlmann  
3. Priv.-Doz. Dr. W. Schwab

Datum der Promotion: 18.09.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

1. <u>EINLEITUNG</u>	6
<b>1.1. Aufbau des hyalinen Knorpels</b>	<b>6</b>
1.1.1. Chondrozyten	6
1.1.2. Extrazelluläre Matrixkomponenten	7
1.1.3. Extrazelluläre Matrix und Chondrozyten	8
1.1.4. Chondrogenese <i>in vitro</i>	9
A. Monolayer-Kultur	9
B. Alginat-Kultur	9
C. Massenkultur (MK)	9
<b>1.2. Integrine (extrazelluläre Matrix-Rezeptoren)</b>	<b>10</b>
1.2.1. Struktur der Integrine	10
1.2.2. Funktion der Integrine und ihre Regulation	11
1.2.3. Integrine und Knorpel	12
<b>1.3. Wirkung von Zytokinen auf hyalinen Knorpel</b>	<b>12</b>
1.3.1. Zytokine	12
1.3.2. Die Rolle der Zytokine bei Arthrose	13
1.3.3. Regulation der Zytokine im Knorpel	14
1.3.4. Knorpel und Arthrose	15
1.3.5. Signalübertragung im Knorpel	16
1.3.6. Signalübertragungswege im Knorpel während der Arthrose	18
1.3.7. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Knorpel	18
<b>1.4. Wachstumsfaktoren</b>	<b>19</b>
1.4.1. Wachstumsfaktoren im Knorpel	19
1.4.2. IGF-I und TGF- $\beta$	20
1.4.3. Wachstumsfaktoren im arthrotischen Knorpel	23
<b>1.5. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)</b>	<b>23</b>
1.5.1. Verfahren der ACT	23
1.5.2. Dedifferenzierung und Redifferenzierung der Chondrozyten <i>in vitro</i>	25

1.5.3. Ansätze zur Verbesserung der ACT	26
<b>2. <u>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</u></b>	<b>28</b>
<b>3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>30</b>
<b>3.1. Materialien</b>	<b>30</b>
3.1.1. Reagenzien	30
3.1.2. Chemikalien und Antikörper	30
<b>3.2. Methoden</b>	<b>31</b>
3.2.1. Gewinnung und Isolierung der humanen Chondrozyten	31
3.2.1.1. Alginat-Kultur	31
3.2.1.2. Chondrozyten in Monolayer-Kultur	32
3.2.1.3. Massenkultur	32
3.2.2. Stimulation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur	32
3.2.2.1. Stimulation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur mit Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	33
3.2.2.2. Stimulation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur mit Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) oder Transforming Growth Factor beta1 (TGF- $\beta$ 1)	33
3.2.2.3. Stimulation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Kombination	33
3.2.3. Stimulation der Chondrozyten in Massenkultur	33
3.2.4. Westernblot Analyse	34
3.2.5. Densitometrie	34
3.2.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	35
3.2.7. Immunelektronenmikroskopie	35
3.2.8. Immunfluoreszenz	36
<b>4. <u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>37</b>
<b>4.1. Kultivierung der Chondrozyten in Monolayer-Kultur</b>	<b>37</b>
4.1.1. Lichtmikroskopie	37
4.1.2. Elektronenmikroskopie	37

<b>4.2. Wirkung von Interleukin-1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>) auf emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur</b>	<b>38</b>
4.2.1. Elektronenmikroskopie	38
4.2.2. Westernblot Analyse	40
<b>4.3. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf mit IL-1<math>\beta</math> stimulierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur</b>	<b>46</b>
4.3.1. Behandlung mit Insulin- like Growth Factor- I (IGF-I)	46
4.3.1.1. Elektronenmikroskopie	46
4.3.1.2. Westernblot Analyse	47
4.3.2. Behandlung mit Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	53
4.3.2.1. Elektronenmikroskopie	53
4.3.2.2. Westernblot Analyse	54
4.3.3. Kombinierte Behandlung mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1	60
4.3.3.1. Elektronenmikroskopie	60
4.3.3.2. Westernblot Analyse	62
4.3.4. Immunfluoreszenz – Darstellung von Kollagen Typ II und $\beta$ <sub>1</sub> -Integrin in Chondrozyten in Monolayer-Kulturen	75
<b>4.4. Chondrogenese</b>	<b>78</b>
4.4.1. Kultivierung der emigrierten Chondrozyten aus Monolayer-Kultur in Massenkultur	78
4.4.2. Kultivierung von primären Chondrozyten und Fibroblasten in Massenkultur	85
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>88</b>
<b>5.1. Kultivierung der Chondrozyten unmittelbar nach der Isolierung in Alginat</b>	<b>88</b>
<b>5.2. Wirkung von IL-1<math>\beta</math> auf Chondrozyten in Monolayer- und Massenkultur</b>	<b>90</b>
5.2.1. Dedifferenzierung, Degeneration und Apoptose	90

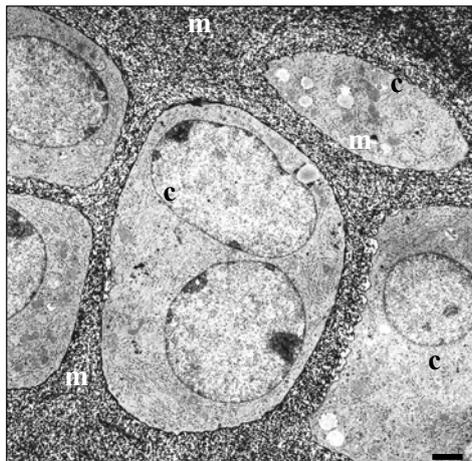
<b>5.3. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf mit IL-1<math>\beta</math>- behandelte Chondrozyten</b>	<b>93</b>
5.3.1. IGF-I	93
5.3.2. TGF- $\beta$ 1	95
5.3.3. Die kombinierte Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1	98
<b>5.4. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Chondrozyten während der Chondrogenese (Chondrozyten in Massenkultur)</b>	<b>101</b>
5.4.1. IGF-I	101
5.4.2. TGF- $\beta$ 1	104
5.4.3. Die kombinierte Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Massenkultur	106
<b>5.5. Mögliche Anwendung der mit Wachstumsfaktoren gewonnenen Zellen für Tissue-Engineering</b>	<b>108</b>
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	110
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	113
8. <u>DANKSAGUNG</u>	124
9. <u>LEBENS LAUF</u>	125
10. <u>ANHANG</u>	127
11. <u>ERKLÄRUNG</u>	128

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Aufbau des hyalinen Knorpels

### 1.1.1. Chondrozyten

Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus Knorpelzellen (Chondrozyten), die in einem Verband aus extrazellulärer Matrix (EZM) eingebettet sind. Der größte Anteil des Knorpels besteht aus EZM und Wasser, welches von der EZM in reichlicher Menge gebunden wird. Die Chondrozyten selbst (Abb. 1) repräsentieren nur ein bis zehn Prozent des Trockengewichtes des Knorpels [1].



**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chondrozyten aus humanem Gelenkknorpel. c=Chondrozyt, m=Matrix; 5000x Vergrößerung; Bar = 1 µm

In den verschiedenen Zonen des Gelenkknorpels haben Chondrozyten eine unterschiedliche metabolische Aktivität, besitzen aber alle zur Synthese und Organisation der EZM notwendigen Zellorganellen wie Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel. Außerdem besitzen sie Mikrotubuli und Intermediärfilamente wie Vimentin, Zytokeratine und Gliales Fibrilläres Saures Protein (GFAP). Eine Besonderheit bilden die zuweilen vorhandenen Zilien, die als Mechanosensoren in die EZM hineinragen [2].

Ausgereifte Chondrozyten sind phänotypisch stabile Zellen und durch die Produktion von Kollagen Typ II und großen Proteoglykan-Aggregaten gekennzeichnet [3]. Die Synthese der Makromoleküle sowie der Einbau von Sulfat in die Glykosaminoglykan-Seitenketten der Proteoglykane ist ein energiebedürftiger Prozess. Die Energiebereitstellung erfolgt in Chondrozyten aufgrund des niedrigen Sauerstoffpartialdrucks im Knorpel vorwiegend auf dem Wege der anaeroben Glykolyse durch Substratkettenphosphorylierung [4]. Da der normale hyaline Gelenkknorpel avaskulär ist, erfolgt der Transport der Nährstoffe auf dem Weg der

Diffusion [2]. Dabei sind die Synovialmembran als erste und die strukturierte und mit unterschiedlichen elektrischen Ladungen versehene EZM des Knorpels als zweite Diffusionsbarriere zu überwinden. Als Transportmedium im Knorpel dient extrazelluläres Wasser. Gelenkbewegungen mit einem ständigen Wechsel von Be- und Entlastung sorgen somit für ausreichende Diffusionsraten [5].

Das Chondron stellt die metabolische und biomechanische Funktionseinheit des Knorpels dar. Chondrone bestehen aus Chondrozyten und einem zwei Mikrometer dicken perizellulären Saum extrazellulärer Matrix.

### 1.1.2. Extrazelluläre Matrixkomponenten

Die EZM des hyalinen Gelenkknorpels besteht zum größten Teil aus Wasser (60 bis 80 Prozent) sowie einem Netzwerk struktureller Makromoleküle, das hauptsächlich aus Kollagen Typ II und Proteoglykanen besteht [6]. Unter mechanischer Belastung wirken die Baueinheiten, vor allem die Proteoglykane des Knorpels als „Wasserkissen“. Beide Bestandteile, Proteoglykane und kollagene Fibrillen, bestimmen mit ihren Wechselwirkungen die besonderen viskoelastischen Eigenschaften des Knorpelgewebes [3]. Kollagen macht im Gelenkknorpel mehr als 50 Prozent des organischen Trockengewichts aus. Im erwachsenen Knorpel entfallen davon etwa 90 Prozent auf Kollagen Typ II [7]. Kollagen Typ II gehört zur Klasse-1-Kollagen-Moleküle, den sogenannten fibrillenformenden Kollagenen. Kollagenmoleküle bestehen aus drei Polypeptidketten. Gemeinsames Strukturmerkmal aller Kollagene stellt die tripelhelikalen Konformation dar. Drei linksgängige helikale Stränge bilden eine rechtsgängige Superhelix aus. Im Extrazellulärraum bilden sich dann die Kollagenfibrillen. Das Netzwerk aus Kollagenfibrillen sorgt für die Spannungstärke im Knorpel und verleiht dem Knorpel somit seine Form [7].

Weitere Kollagenfasern sind an der Bildung des Endoskeletts beteiligt. Es handelt sich dabei um Klasse-3-Kollagene der Typen VI, IX und X sowie kleinere Kollagentypen, wie Kollagen Typ XI [8]. Kollagen Typ IX scheint kovalent mit Kollagen Typ II verlinkt zu sein und damit als interfibrilläres Konnektormolekül zu fungieren [7]. Kollagen Typ VI ist Teil der Matrix, welche unmittelbar um die Zelle herum liegt und scheint bei der Anheftung der Chondrozyten an das sie umgebende Netzwerk aus Matrix eine Rolle zu spielen [2].

Etwa 20 bis 40 Prozent des Trockengewichts der extrazellulären Matrix im Knorpelgewebe machen Proteoglykane aus. Proteoglykane sind hochmolekulare Makromoleküle, die hauptsächlich in der EZM von Binde- und Stützgeweben vorkommen [7]. Als stark hydrophile Makromoleküle binden Proteoglykane Wasser und halten es in der Matrix zurück [9]. Der

Hauptvertreter der Proteoglykane im hyalinen Knorpel ist das Aggrekan. Es besteht aus einem Core Protein mit einem Molekulargewicht von 215 kDa, an welches Glykosaminoglykane (Chondroitinsulfat und Keratinsulfat) und Oligosaccharide kovalent gebunden sind [7]. Die anionischen Glykosaminoglykan-Seitenketten vermitteln die physikochemischen Eigenschaften der Proteoglykane [10]. Aggrekan und andere Proteoglykane halten und speichern Wachstumsfaktoren in der EZM und funktionieren somit als Organisatoren der Matrix und des Knorpelgewebes an sich [11]. Biglykan und Dekorin sind zwei weitere, kleinere Proteoglykane, die im hyalinen Knorpel vorkommen. Sie sind vor allem in den oberflächlichen Schichten des Gewebes nachweisbar [12].

### 1.1.3. Extrazelluläre Matrix und Chondrozyten

Aufgrund der geringen Verteilung der Zellen im Knorpelgewebe fehlen spezifische Zell-Zell-Kontakte. Die Kommunikation der Zellen untereinander findet daher über die Matrix statt [7]. Die EZM wird ursprünglich von proliferierenden Chondrozyten produziert und in den Extrazellularraum sezerniert. Die Zellen selbst sind es auch, die diese Matrix organisieren, das heißt Synthese-, Ab- und Umbauraten kontrollieren und somit für ein Gleichgewicht sorgen. Auf diesem Weg wird die EZM im Rahmen des „Remodellings“ stabilisiert oder neu geformt [2]. Tatsächlich besitzen Chondrozyten die Fähigkeit, die Zusammensetzung ihrer sie umgebenden Matrix zu erkennen und diese, im Sinne einer positiven Rückkopplung, erneut zu produzieren. So bewirkt beispielsweise die Zugabe hoher Konzentrationen an Proteoglykanen *in vitro* eine gesteigerte Synthese dieser Matrixproteine [13]. Damit die Zelle ihre Matrix aufrechterhalten kann, erhält sie über verschiedene Wege Information aus ihrer Umgebung: über mechanische Signale, über gelöste Signale und über die Interaktion mit der EZM. Diese Zell-Matrix-Interaktionen werden durch verschiedene zellmembranständige Rezeptoren vermittelt [14].

Die Funktion der EZM ist allerdings nicht nur ein mechanisches Gerüst zur Stabilisierung des Knorpelgewebes. Sie spielt eine wesentliche Rolle während des Wachstums und der Differenzierung der Chondrozyten. Es ist bekannt, dass eine intakte und gut organisierte Matrix für das Überleben der Zellen essentiell ist. Unstrukturierte oder zerstörte Matrixstrukturen, wie sie bei älteren Patienten und in pathologisch verändertem Knorpelgewebe zu finden sind, führen zu einer Dedifferenzierung der Zellen, zu einer Umformung der Zellen in fibroblastenähnliche Zellen und letztendlich zur Apoptose [15]. Ein Blockieren der Zell-Matrix-Interaktion führt ebenfalls zu einer Veränderung der Zellform, bis hin zur Apoptose der Zelle [16].

#### 1.1.4. Chondrogenese *in vitro*

##### A. Monolayer-Kultur

Zur Züchtung und Vermehrung von Chondrozyten wird bereits seit Jahrzehnten die Kultur in Monolayer verwendet. Es ist eine ökonomisch und technisch einfache Methode. Voraussetzung ist die Isolierung der Zellen aus ihrer EZM. Nach enzymatischer Isolierung der differenzierten Knorpelzellen aus Extremitätenanlagen oder einer mittels Biopsie gewonnenen Knorpelprobe lassen sich diese Zellen bei geringer Dichte unter geeigneten Bedingungen als Monolayer kultivieren. Sie behalten ihren Differenzierungsstatus bei und synthetisieren ihre spezifische Matrix [15]. In der Monolayer-Kultur ist jedoch der Phänotyp der Chondrozyten labil, das heißt nach wenigen Tagen dedifferenzieren sie und wandeln sich zu fibroblastenähnlichen Zellen um. Sie verändern ihre Form, bilden Kollagen Typ I, ändern das Muster ihrer Proteoglykansynthese und auch ihrer Oberflächen-Rezeptoren [15]. Der Differenzierungsgrad der Chondrozyten in der Kultur soll sowohl von den Kulturmedien aber auch von Hormonen und Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  [17], IGF [18] und Zytokinen wie Interleukinen [19] abhängig sein. Teilweise synthetisieren die Zellen selbst auto- oder parakrine Substanzen [20].

##### B. Alginat-Kultur

Alginat ist ein aus Braunalgen gewonnenes lineares Polysaccharid, das aus L-Guluronsäure und D-Mannuronsäure besteht und  $\beta$ -1,4- und  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpft ist. Alginat polymerisiert und bildet in Gegenwart von divalenten Kationen wie Kalziumionen ein Gel aus [21]. Ein großer Vorteil von Alginat besteht darin, dass es sich durch chelatbildende Substanzen wie EDTA leicht wieder auflösen lässt. Dadurch können die kultivierten Zellen anschließend gut untersucht werden [22]. In diesem Sinne scheint Alginat ein hervorragendes Modell zur Kultivierung von Chondrozyten in einem dreidimensionalen System zu sein und kann zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen und Matrixstrukturen herangezogen werden. Die im Alginat gebildete EZM weist ähnliche Eigenschaften auf wie es *in vivo* Verhältnissen im hyalinen Gelenkknorpel entspricht. Tatsächlich ist es möglich, in dem 3D-Modell Alginat den knorpeltypischen Phänotyp aufrecht zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass dedifferenzierte humane Chondrozyten während der Kultivierung in Alginat wieder redifferenzierten [23].

##### C. Massenkultur (MK)

Für die Massenkultur werden Chondrozyten in Form eines Zellpellets auf einen Membranfilter aufgebracht. Dieser befindet sich auf einer Stahlnetzbrücke an der Luft-Medium-Grenze. Untersuchungen zeigen zunächst eine Annäherung der Zellen aneinander. Enge Zell-Zell-

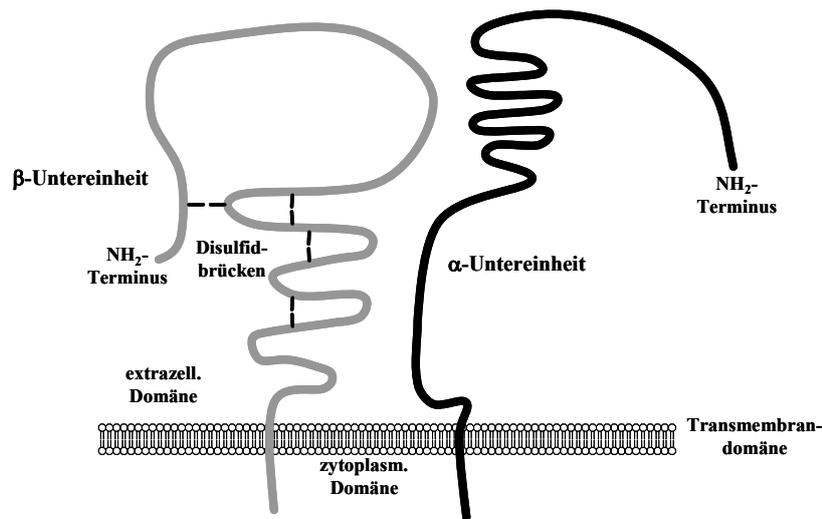
Kontakte spielen eine bedeutende Rolle während der ersten Phase der Differenzierung der Zellen im Rahmen der Chondrogenese. Es schließt sich die Bildung interzellulärer Spalten an, die anschließend durch noch zunächst irreguläre Matrixfibrillen gefüllt werden. Nach drei bis fünf Tagen in Massenkultur zeigen sich typische runde bis ovale Chondrozyten mit kleinen Zytoplasmafortsätzen, die in ein Netzwerk aus extrazellulären Matrixfibrillen eingelagert sind. Die Zellorganellen sind gut organisiert und entwickelt [24]. Chondrozyten in Massenkultur bietet sich somit die Möglichkeit in einer dreidimensionalen Kultur ähnlich den *in vivo* Bedingungen zu wachsen. Dies stellt einen enormen Vorteil im Vergleich zur Monolayer-Kultur dar. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen der Passagen eins bis vier aus Monolayer-Kultur nach Überführung in Massenkultur auch fähig waren zu redifferenzieren und Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane zu produzieren. Dedifferenzierte Chondrozyten ab Passage fünf waren nicht in der Lage in einer 3D-Kultur zu redifferenzieren. Sie blieben fibroblastenähnlich oder apoptotisch [25].

## **1.2. Integrine (extrazelluläre Matrix-Rezeptoren)**

### 1.2.1. Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere transmembranäre Glykoproteine. Der Begriff „Integrin“ wurde von Tamkun beschrieben und leitet sich aus der integrativen Funktion dieser Zellmembranrezeptoren zwischen den Komponenten der EZM und den intrazellulären zytoskelettalen Proteinen ab [26]. Neben einer physikalischen Adhäsionsfunktion sind Integrine als wichtige Signalüberträger in bi-direktionalen Signalwegen durch die Zellmembran (*outside-in*- und *inside-out*-Signalwege) beteiligt [27].

Integrine bestehen aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die im Bereich der Kopfregion über nichtkovalente Bindungen miteinander verbunden sind. Bis jetzt sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und 9  $\beta$ -Untereinheiten charakterisiert worden, die 25 verschiedene Heterodimere bilden können. Die Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bestimmt die Ligandenspezifität. Die meisten Zellen bilden unterschiedliche Integrine und können daher mit verschiedenen Matrixkomponenten Bindungen eingehen, wobei ein bestimmtes Matrixmolekül auch Bindungsstellen für verschiedene Integrine haben kann [27].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Integrinrezeptors mit seinen Untereinheiten; modifiziert nach Hynes 1992 [27].

Durch Röntgenstrukturanalysen wurde zum ersten Mal die Struktur eines Integrinmoleküles, des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptors, dargestellt [28]. Jede  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem transmembranären Abschnitt und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Abb. 2). Die extrazelluläre Domäne bildet den größten Teil des Integrinmoleküls. Sie besteht aus einer Kopfreion, aus der eine gestreckte Stelzenregion hervorgeht. Über die transmembranäre und die zytoplasmatische Domäne ist das Integrinmolekül mit zytoplasmatischen zytoskelettalen Molekülen verknüpft.  $\alpha$ -Untereinheiten haben ein Molekulargewicht zwischen 150 und 200 kDa und bestehen aus 1000 bis 1150 Aminosäureresten.  $\beta$ -Untereinheiten haben mit Ausnahme der  $\beta_4$ -Untereinheit Molekulargewichte zwischen 90 und 110 kDa und eine Länge zwischen 730 und 800 Aminosäuren ( $\beta_4$ -Untereinheit hat circa 1750 Aminosäuren) [29].

### 1.2.2. Funktion der Integrine und ihre Regulation

Integrine vermitteln als spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren eine Zell-Zell- und eine Zell-Matrix-Adhäsion. Diese Adhäsion hat eine fundamentale Bedeutung für die Zelle, zum Beispiel für die Verankerung und die Migration der Zellen sowie für die Übermittlung extrazellulärer Signale [30]. Die EZM hat, abhängig von ihrer Zusammensetzung und den involvierten Zellen in der Matrix, Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung, das Wachstum und Verhalten der Zellen [31]. Diese Beobachtung zeigt die Existenz unterschiedlicher Signale bei den einzelnen

Integrinen. An der Integrin induzierten Signaltransduktion beteiligen sich verschiedene intrazelluläre Signalwege. So wird die Beteiligung der Tyrosin-Kinase FAK (Fokale Adhäsionskinase) und der Src-Kinase-Familie, der Serin-Threonin-Kinase Proteinkinase C (PKC), Mitogen-activated-Kinase (MAPKinase) und Integrin-linked Kinase (ILK), die Regulation der Rho-Familie GTPasen sowie der Anstieg der intrazellulären Konzentration freien Kalziums diskutiert [32].

Proteinphosphorylierungen bilden wahrscheinlich eine der ersten Antworten auf die Aktivierung der Integrine [33]. Phosphoryliert werden sowohl Zytoskelettproteine (zum Beispiel  $\alpha$ -Aktinin, Talin, Paxillin, Tensin), Enzyme wie Src-Kinasen und FAK, die eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion spielen, als auch Integrine selbst [34].

### 1.2.3. Integrine und Knorpel

Durch verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen sowie verschiedene Methoden wie Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Immunopräzipitation und FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten eine Vielzahl von Integrinen ausbilden, die mehrheitlich zur Gruppe der  $\beta_1$ -Integrine oder zur Gruppe der  $\alpha_V$ -Integrine gehören. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Rezeptoren für Kollagen Typ II ( $\alpha_1\beta_1$ -,  $\alpha_2\beta_1$ -,  $\alpha_3\beta_1$ - und  $\alpha_{10}\beta_1$ -Integrine) [35].

Somit ist die „Andockung“ der Chondrozyten an wichtige Strukturmoleküle der perizellulären Matrix, wie sie sich im Chondron präsentieren, durch überlappende Substratspezifität der Integrine gewährleistet [36]. Versuche zur Hemmung der Adhäsion unter Verwendung entsprechender monoklonaler Integrin-Antikörper belegen die Bedeutung der einzelnen Integrine als Rezeptoren für die Bindung an bestimmte Moleküle der EZM [37]. Bemerkenswerterweise sind  $\beta_1$ -Integrine auch in nichtzellgebundener Form in der Knorpelmatrix lokalisiert, wo sie in die Organisation der EZM eingebunden sein sollen [38]. Im adulten humanen Gelenkknorpel dominiert  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, der klassische Fibronectin-Rezeptor, gegenüber  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin [39].

## 1.3. Wirkung von Zytokinen auf hyalinen Knorpel

### 1.3.1. Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert werden. Sie haben ein Molekulargewicht von weniger als 30 kDa und weisen eine nur geringe Halbwertszeit im Organismus auf [40]. Man kann lösliche und zellmembrangebundene Zytokine unterscheiden, die im Rahmen von Immunprozessen gebildet werden. Hierbei

beeinflussen sie die Zellfunktion, aber auch die Differenzierung und Proliferation der Zellen. Man teilt die Zytokine in zwei Hauptgruppen mit pro- oder antiinflammatorischer Wirkung ein [40]. Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählen Interleukine, Tumor Nekrose Faktoren und Interferone. Vor allem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von knorpelzerstörenden Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis und Arthrose [41]. In die Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine gehören IL-4, IL-10 und IL-13. In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine hemmen [42]. Die Wirkung der Zytokine wird durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Neben der Wirkung auf umliegende Zellen (parakrin) sind Zytokine außerdem in der Lage ihre eigene Produktion zu regulieren (autokrin) [40].

### 1.3.2. Die Rolle der Zytokine bei Arthrose

Arthrose ist die am weitesten verbreitete Gelenkerkrankung beim Menschen. Am häufigsten sind die großen, am stärksten belasteten Gelenke wie Knie- und Hüftgelenk betroffen. Im Verlauf der Arthrose weist der Knorpel Veränderungen, wie eine Verringerung der Zellzahl, Abbau der EZM, Auffaserung und Aufweichung bestimmter Areale, Abrieb des Knorpels und Osteophytenbildung auf, so dass schließlich im Spätstadium der subchondrale Knochen zu Tage tritt. Arthrose entsteht aus einem multifaktoriellen Geschehen. Prädispositionen wie zunehmendes Alter, genetische Dispositionen (zum Beispiel Mutationen der Kollagen Typ II-Gene) und Fehlbelastungen beziehungsweise Überlastungen in den Gelenken begünstigen ihre Entstehung. Im Alter sinkt der Zellgehalt im Knorpel aufgrund einer erhöhten Apoptoserate ab [43]. Bei Fehlbelastungen geraten die Chondrozyten unter mechanischen Stress und reagieren mit der Produktion von Entzündungsmediatoren [44]. Von Synovialzellen, Makrophagen und Chondrozyten freigesetzte proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  spielen eine entscheidende Rolle in der Arthrose-Pathogenese [41]. IL-1 $\beta$  wird zunächst als inaktive Vorstufe mit einem Molekulargewicht von 31 kDa synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung wird später die aktive Form mit 17,5 kDa freigesetzt. Verantwortlich für diese Spaltung ist das IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE oder Caspase-1) [45]. Die katabole Funktion von IL-1 $\beta$  wird durch den auf der Zelloberfläche von Chondrozyten lokalisierten IL-1 $\beta$ -Rezeptor Typ I vermittelt. Dieser ist bei arthrotisch verändertem Knorpel auf der Zelloberfläche der Chondrozyten sowie auf Synoviozyten verstärkt exprimiert [46].

TNF- $\alpha$  wird als Vorstufe mit 76 Aminosäuren produziert. Das TNF- $\alpha$ -converting-enzyme (TACE) nimmt die proteolytische Spaltung vor. Es entsteht ein 17 kDa Protein, welches oligomerisiert und Trimere bildet [47]. TNF- $\alpha$  bindet an zwei spezifische auf der Zellmembran lokalisierte Rezeptoren. Nach ihrem Molekulargewicht werden sie als TNF-R55 (55 kDa) und TNF-R75 (75 kDa) benannt. TNF-R55 scheint dominierend an der Vermittlung der TNF- $\alpha$ -Aktivität beteiligt zu sein. Es konnten erhöhte Mengen an TNF-R55 sowohl in arthrotisch veränderten Chondrozyten als auch in Synoviozyten nachgewiesen werden [48]. Durch proteolytische Spaltung der TNF-Rezeptoren entstehen außerdem zwei lösliche Formen (TNF-sR). Es konnten vermehrt freigesetzte Mengen an TNF-sR75 sowohl aus Synoviozyten als auch aus arthrotischen Chondrozyten nachgewiesen werden [48]. Die löslichen Formen der TNF-Rezeptoren scheinen die trimere Struktur von TNF- $\alpha$  zu stabilisieren und damit die Halbwertszeit zu erhöhen [49]. Die Wirkungen von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf Chondrozyten im Rahmen des Knorpelabbaus scheinen sich zu ähneln. Es werden sogar synergistische Effekte der beiden Zytokine beschrieben. So konnte in einem Tierexperiment gezeigt werden, dass die Stimulation mit beiden Zytokinen einen höheren Knorpelabbau zur Folge hatte als die Induktion mit nur einem der beiden [50].

Die Auslöser für die Zytokininduktion in den Chondrozyten sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Viele Faktoren, die in die Homöostase des Knorpels störend eingreifen, führen zur Zytokininduktion wie zum Beispiel mechanischer Stress und bestimmte Abbauprodukte der EZM wie Fibronectinfragmente [51]. Proinflammatorische Zytokine bewirken ein Absinken der Synthese von knorpelspezifischen Matrixproteinen wie Kollagen Typ II und Aggrecan [52]. Außerdem steigern sie die Synthese proinflammatorischer Enzyme wie COX-2 und Matrixabbauender Enzyme, wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen [52]. Die COX-Produktion führt weiterhin zur Bildung von Prostaglandin E2. Andererseits bilden die Zellen vermehrt knorpelunspezifische Kollagen Typen (Typ I, III und V) [53]. Die Zusammensetzung der EZM [54] verändert sich und die Chondrozyten weisen Dedifferenzierungsmerkmale auf. Die physikalische Widerstandskraft des Gelenkknorpels lässt nach und damit fallen weitere Abbau- und Abriebprodukte der Matrix wie Fibronectinfragmente an, die erneut Zytokine und MMPs induzieren [51].

### 1.3.3. Regulation der Zytokine im Knorpel

Die Regulation der Zytokinproduktion ist im Einzelnen noch nicht aufgeklärt. Die Entzündungsprozesse im Rahmen der Arthrose werden durch proinflammatorische Zytokine

induziert, zu denen IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  sowie IL-17 und IL-18 gehören. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  und verschiedene Wachstumsfaktoren wie der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) schwächen die Entzündungsreaktion ab. Man weiß außerdem, dass verschiedene Faktoren, wie mechanische Stimuli, das heißt Druck- und Zugkräfte je nach Ausmaß, ob intermittierend oder kontinuierlich einwirkend, auf sie Einfluss nehmen. Sie beeinflussen positiv oder negativ über zellmembranständige Mechanorezeptoren auch die Zytokinproduktion der Chondrozyten [55]. Positive mechanische Reize steigern über den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 die Kollagen Typ II- und Aggrekan-Expression und hemmen gleichzeitig die IL-1 $\beta$ -Expression [56]. Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 werden beim Matrixabbau freigesetzt und hemmen die Zytokin- und MMP-Produktion [57] und induzieren außerdem „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1), einen natürlichen MMP-Inhibitor [58].

Für die Arthrosetherapie stellt sich die Frage, ob es in Chondrozyten eine zentrale Schlüsselstelle als potentiellen Angriffspunkt für Therapeutika gibt, über die die Zytokinexpression und Zytokin-induzierten Effekte wie MMP-Induktion, COX-Aktivierung, Matrixsynthesehemmung und Apoptose reguliert werden können. IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -vermittelte Signalübertragungswege in den Chondrozyten führen über Bindung an den entsprechenden Rezeptor zur Aktivierung des ubiquitären Transkriptionsfaktors Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) oder des Aktivator Proteins-1 (AP-1) [59]. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat eine große Bedeutung im Rahmen von Entzündungsprozessen, da es die Expression von Genen reguliert, die wiederum für verschiedene proinflammatorische Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Wachstumsfaktoren sowie für induzierbare Enzyme wie COX-2 oder iNOS (inducible nitric oxide synthase) kodieren [60].

#### 1.3.4. Knorpel und Arthrose

Als Apoptose (programmierter Zelltod), bezeichnet man im Gegensatz zur Nekrose eine aktive, energieabhängige Form des Zelltodes, bei der keine Entzündungserscheinungen beobachtet werden können. Die Apoptose kann einerseits durch Bindung eines Liganden an einen zellmembranständigen „death“-Rezeptor oder durch Hemmung der Aktivität eines „death“-Suppressors eingeleitet werden. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung einer Gruppe von Cystein-Proteasen, den Caspasen, die eine zentrale Rolle während der Apoptose spielen [61]. Sie werden mit einer Prodomäne als Proenzyme synthetisiert. Zur Aktivierung wird diese Prodomäne meist von anderen Caspasen abgespalten, so dass in einer Aktivierungskaskade weitere Caspasen aktiviert werden. „Initiator“-Caspasen (zum Beispiel Caspase-8) aktivieren

„Effektor“-Caspasen (zum Beispiel Caspase-3) und diese spalten schließlich wichtige Struktur- und Funktions-Proteine in der Zelle wie PARP (poly-[ADP-Ribose]Polymerase), DNase-Inhibitoren und Lamine [62].

Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Vorgängen wie der Embryogenese und der enchondralen Ossifikation. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Apoptoserate auch an der Pathogenese von Arthrose beteiligt ist [63]. Bei Chondrozyten sind verschiedene Apoptose-Stimuli bekannt. Dazu zählen NO- (nitric oxide-) Donatoren sowie Apoptose-Rezeptoren der TNF-Familie und andere wie CD95 (Fas) [64,65] aber auch mechanischer Stress [66]. Viele dieser Apoptosewege konvergieren in der Aktivierung der Caspase-3. Aus diesem Grund werden als neuer Ansatz für die Arthrose-Therapie derzeit Caspasehemmer (zum Beispiel Z-VAD-FMK [benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone]; Ac-DMQD-CHO [acetyl-L-aspartyl-L-methionyl-L-glutaminy-L-aspartyl-aldehyde]) *in vitro* überprüft [67]. Es ist weiterhin bekannt, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Chondrozyten Apoptose induzieren können [68]. Es ist bisher nicht exakt geklärt, welche Apoptosewege durch IL-1 $\beta$  stimuliert werden. Aber auch antiapoptotische Effekte von IL-1 $\beta$  konnten nachgewiesen werden, die vielleicht über eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zum Tragen kommen [69]. NF- $\kappa$ B reguliert die Transkription einiger antiapoptotischer Gene für mitochondriale Proteine wie zum Beispiel Bcl-2, Bcl-xL [70]. Es ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B in bestimmten Zelltypen proapoptotisch, in anderen dagegen antiapoptotisch wirkt.

Mitochondrien, die Energieproduzenten der Zelle, spielen in der Regulation der Apoptose eine zentrale Rolle. In arthrotischen Chondrozyten konnte eine Veränderung der Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden [71]. In anderen Zelltypen scheint NF- $\kappa$ B die mRNA-Expression mitochondrialer Gene bei Zytokinstimulation zu regulieren [70]. Apoptosestimuli führen während der Apoptose in den Mitochondrien zu einer vermehrten Freisetzung von Reactive Oxygen Intermediates (ROI) [72].

#### 1.3.5. Signalübertragung im Knorpel

Die EZM spielt die zentrale Rolle in der Differenzierung der Chondrozyten sowie in der Aufrechterhaltung des chondrogenen Phänotyps. Die Bindung der EZM über Integrine führt zu einer Aktivierung des Ras-MAPkinase Signalweges. Nach der Bindung von Kollagen an den Integrinrezeptor, der wiederum mit dem IGF-Rezeptor assoziiert ist, kommt es zunächst zu einer Komplexbildung mit dem src homologous collagen-like (Shc) [38]. Shc wurde ursprünglich als ein Proto-Onkogen identifiziert [73]. Es konnte gezeigt werden, dass IGF-I Adaptorproteine wie

Shc stimuliert und desweiteren, dass Shc mit den  $\beta_1$ -,  $\alpha_1$ - und  $\alpha_5$ -Untereinheiten der Integrine assoziiert und damit die Signaltransduktion aus dem Extrazellularraum weiterleitet. Der IGF-IR assoziiert ebenfalls mit Shc. Diese Interaktion konnte durch Stimulation mit IGF-I noch verstärkt werden [74].

An FAK gebundenes und aktiviertes Shc ist allein oder nach Interaktion mit Grb-2 an der weiteren Signaltransduktion beteiligt [75]. Es bildet sich ein erweiterter Komplex bestehend aus Shc/Grb2/Erk aus, der zur Aktivierung des Ras-MAPkinase Signalweges führt [74]. MAPKinasen bilden die Endglieder einer innerhalb eines Moduls angeordneten Enzymkaskade, bestehend aus den drei Komponenten MAPKinase (MAPK), MAPKinase-Kinase (MAPKK) sowie MAPKinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). MAPKinasen werden durch duale Phosphorylierungen von Threonin und Tyrosin aktiviert. Ein Teil der aktiven MAPKinasen gelangt in den Zellkern und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren [76]. Auf diese Weise wird innerhalb von Minuten nach einem extrazellulären Signal das Muster der Genexpression verändert. Die dabei exprimierten Gene werden als sofortige Frühgene bezeichnet, zu denen zum Beispiel fos gehört. MAPK p44 (Erk 1) und MAPK p42 (Erk 2) sind wichtige Mediatoren in intrazellulären Signalprozessen. MEK1 (mitogen activated protein kinase/ Erk kinase) und MEK2 regulieren durch Phosphorylierung die Aktivität von Erk 1/2. Aktiviertes Erk 1/2 transloziert in den Zellkern, wo es die Aktivitäten verschiedener nukleärer Transkriptionsfaktoren reguliert [77]. Es konnte gezeigt werden, dass das Adapterprotein Shc mit den aktivierten Signalproteinen Erk 1/2 in den Chondrozyten einen Komplex bildet [78]. Eine spezifische Hemmung von Erk 1/2 resultiert in der Aktivierung von Caspase-3 und der Spaltung von PARP in menschlichen Chondrozyten *in vitro* [62].

Einer der wichtigsten chondrogenen spezifischen Transkriptionsfaktoren ist Sox9. Sox9 gehört zur Sox-Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese sind durch eine high-mobility-group (HMG)-box deoxyribonucleic acid (DNA)-bindungsdomäne charakterisiert [79]. Sox9 wird als sogenanntes "master gene" der Chondrogenese bezeichnet und bindet an die Promotorregionen für Aggrekan, Kollagen Typ II, XI und COMP [80]. Sox9 ist somit wesentlicher regulatorischer Faktor in der Differenzierung der Chondrozyten [77]. Heterogene Mutationen im und um das *Sox9*-Gen herum verursachen Dysplasien, wie das schwere Kleinwuchssyndrom, was durch Anomalien in allen Skelettteilen, die Korpelgewebe entspringen, gekennzeichnet ist [81]. Die Aktivierung von Sox9 scheint über den MAPK Signalweg zu erfolgen. Murakami et al. konnten zeigen, dass eine gesteigerte Sox9-Expression durch den MEK-MAPK Signalweg vermittelt wird [79].

### 1.3.6. Signalübertragungswege im Knorpel während der Arthrose

Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Arthrose spielen katabole Zytokine, welche die Homöostase zwischen anabolen und katabolen Mediatoren stören. Die Sekretion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führt zu einer Aktivierung von Proteasen, zu einer Produktion von Matrixkomponenten, die in gesundem Gelenkknorpel nicht vorhanden sind, sowie zu einer weiteren Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Dadurch wird die Proliferation der Chondrozyten gehemmt und der Zelltod induziert [68]. Die katabolen Effekte von IL-1 $\beta$  werden im wesentlichen über die drei Signalwege der MAPKinasen vermittelt: Erk, p38 und JNK [82]. Ein vierter Weg ist die IL-1 $\beta$ -induzierte Signaltransduktion über NF- $\kappa$ B [83]. Zunächst bindet IL-1 $\beta$  an den IL-1-Rezeptor I (IL-1RI). Es bildet sich ein Komplex mit dem IL-1R-accessory-protein (IL-1RacP). Die Verbindung der zytoplasmatischen Komponente des IL-1RI mit dem IL-1RacP induziert nun die Signaltransduktion. Es kommt zu einer Rekrutierung von IL-1-Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK-1 und IRAK-2). Diese interagieren mit dem TNF-Rezeptor Aktivierten Faktor (TRAF). Auf diesem Weg wird die Brücke zur NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK), welche den IKK- $\alpha\beta$ -Komplex phosphoryliert geschlagen. Durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  kommt es schließlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B [84].

Eine der ersten Reaktionen der Zelle auf die Zerstörung ihrer DNS ist die Aktivierung des nukleären Enzyms Poly- (ADP-Ribose) Polymerase (PARP). Es ist bekannt, dass PARP in zahlreiche nukleäre Prozesse wie DNS Reparatur, DNS Replikation und Apoptose verwickelt ist [85]. Im Rahmen apoptotischer Vorgänge wird PARP von ursprünglich 116 kDa in zwei Fragmente mit ~85 kDa und 25 kDa aufgespalten [62].

### 1.3.7. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Knorpel

Metalloproteinasen sind metallabhängige Endoproteinasen, die aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihres pH-Optimums im neutralen Bereich für den überschießenden Knorpelabbau bei Arthrose eine überragende Rolle spielen [86]. Bisher konnten in humanen Geweben 24 verschiedene MMPs identifiziert werden [87]. Unterschieden nach Substratspezifität, Primärstruktur und zellulärer Lokalisation können fünf Hauptgruppen gebildet werden. Die Gruppe der Kollagenasen beinhaltet MMP-1, -8 und -13, die der Gelatinasen MMP-2 und -9. Zu einer weiteren Gruppe, die der Stromelysine, gehören MMP-3 und -10. MMP-7 und -26 bilden die Gruppe der Matrilysine und eine fünfte Gruppe beinhaltet die membrane-type-Metalloproteinasen (MT-MMPs) mit MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -26 [88].

Die Regulation der Enzymaktivität der verschiedenen MMPs erfolgt durch spezifische Inhibitoren (TIMPs: tissue inhibitors of metallproteinases) und durch unspezifische Inhibitoren wie  $\alpha$ 2-Makroglobulin [89]. Nach ihrer Sekretion liegen TIMPs entweder als Komplex mit verschiedenen Proteoglykanen der EZM oder membrangebunden in Assoziation mit MT-MMPs vor [90].

Für den Kollagenabbau spielen die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 eine entscheidende Rolle, da nur sie in der Lage zu sein scheinen, die Peptidbindungen der nativen Kollagentripelhelix der fibrillären Kollagene Typ I, II und III zu spalten [91]. MMP-13 ist die bevorzugte Kollagenase zur Spaltung von Kollagen Typ II, während MMP-1 und MMP-8 effektiver Kollagen Typ III beziehungsweise Kollagen Typ I spalten [92]. Zum Substratspektrum der Kollagenasen gehören weitere Kollagene, so zum Beispiel die in der Knorpelmatrix vorkommenden Typen V, VI, IX, X und XI [91]. Vor allem MMP-13 und MMP-1 sind für die Kollagenolyse im arthrotischen Knorpel pathogenetisch bedeutsam [93]. Für MMP-13 stellen die „residenten“ Kollagenfibrillen der territoriellen und interterritorellen Knorpelmatrix bevorzugte Substrate dar, während neu synthetisiertes Kollagen eher durch MMP-1 gespalten wird [8]. Die Hemmung der MMP-Aktivität durch synthetische und spezifische Inhibitoren gehört mittlerweile zur Therapie von Arthritiden [94].

## **1.4. Wachstumsfaktoren**

### **1.4.1. Wachstumsfaktoren im Knorpel**

Es ist bekannt, dass Wachstumshormone [95] und Wachstumsfaktoren wie *TGF- $\beta$* , Transforming Growth Factor- $\beta$ [17], *IGF*, Insulin-like Growth Factor [18,96], *FGF-2*, Fibroblast Growth Factor-2 [97], *OP-1*, Osteogenic Protein [98], *Interleukine* [19], *Prostaglandine* [99], *Parathormone* [100] und *BMP*, Bone Morphogenetic Protein [101] die grundlegenden Lebensprozesse der Knorpelzellen, ihren Metabolismus und ihre Aktivität *in vitro* beeinflussen können und den Phänotyp stabilisieren.

Wachstumsfaktoren bestimmen somit Proliferation, Überleben, Matrixsynthese und damit Differenzierung und Dedifferenzierung der Knorpelzellen. Sie stimulieren verschiedene anabole Prozesse, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase des gesunden Knorpels außerordentlich wichtig sind. Störungen in der Bilanz der Wachstumsfaktoren könnten eine Ursache für Knorpelerkrankungen darstellen. Wachstumsfaktoren, wie IGF-I und TGF- $\beta$ 1 sind wesentlich an der Synthese und Ablagerung der EZM beteiligt und damit wichtige Regulatoren der Knorpelhomöostase [102]. Da der Knorpel frei von Blutgefäßen ist, beschränkt sich die Zufuhr

von Wachstumsfaktoren über das Blutserum auf die Diffusion von Wachstumsfaktoren aus der Synovia in den Knorpel. So spielt der Chondrozyt selbst eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren vor allem in den tieferen Knorpelschichten. Diese wirken somit vor allem in autokriner und parakriner Weise als lokale regulatorische Faktoren im Knorpel. Viele Wachstumsfaktoren werden in der Knorpelmatrix in inaktiver Form gespeichert und beim Matrixabbau zum Beispiel beim natürlichen Remodelling des Knorpels durch Enzyme (MMPs) freigesetzt. Immer häufiger konnte außerdem gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren (zum Beispiel IGF-I und OP-1) in synergistischer Weise auf die Knorpelzellen Einfluss nehmen [98]. Auch für IGF-I und TGF- $\beta$  gibt es Hinweise auf einen synergistische oder additive Effekte [103].

Neben IGF-I und TGF- $\beta$  stellt bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) einen weiteren wichtigen Wachstumsfaktor im Knorpel dar, welcher ebenfalls die Proliferation der Chondrozyten steigert. In konzentrationsabhängigen Versuchen konnten Einflüsse auf die Matrixproduktion nachgewiesen werden. So bewirken niedrige Konzentrationen an bFGF eine Steigerung, hohe Konzentrationen eine Abnahme der Synthese der Matrixproteine [104]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass bFGF die RNA- und DNA-Synthese sowie die Zellteilung stimuliert [105]. FGFs zählen zu den potentesten Wachstumsfaktoren *in vivo* und *in vitro* und weisen synergistische Effekte mit EGF, IGF-I und TGF- $\beta$  auf [106]. Guerne et al. konnten zeigen, dass die Wirkungen von FGFs auf Chondrozyten geringer waren als die von TGF- $\beta$  oder PDGF (Platelet Derived Growth Factor), wohingegen die Effekte auf Fibroblasten im Vergleich zu TGF- $\beta$  höher waren [107].

#### 1.4.2. IGF-I und TGF- $\beta$

IGF-I und TGF- $\beta$  sind die wahrscheinlich potentesten Regulatoren für die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten. Sie wurden deshalb für das Projekt ausgewählt.

IGF-I (auch als Somatomedin C bezeichnet) kann man als den wichtigsten anabolen Faktor im gesunden Gelenkknorpel bezeichnen [108]. IGF-I wird sowohl in der Leber als auch in fetalen Geweben von Mesenchymzellen gebildet. Postnatal enthält das humane Serum eine Konzentration von 200 ng/ml IGF-I. IGF-I ist außerdem in der Synovia (30-50 ng/ml) und in Knorpelgewebe (3-9 ng/ml) enthalten [109]. Es gelangt über die Synovia zu den Chondrozyten, wird allerdings auch selbst von Chondrozyten produziert. So wirkt IGF-I in endokriner, parakriner und autokriner Weise auf das Zielgewebe [110]. IGF ist ein Polypeptid, welches 70 Aminosäuren umfasst, mit einer Proteinsequenz, die der des Insulins ähnelt. In der

Synovialflüssigkeit zirkulierend erreicht es das Knorpelgewebe. Es können zwei Unterformen unterschieden werden: IGF-I mit einem Molekulargewicht von 7,5 kDa und IGF-II mit 7,4 kDa [111]. IGF-I spielt eine wesentliche Rolle in der Homöostase des Knorpels. In *in vitro* Studien konnte demonstriert werden, dass IGF-I die Synthese von Proteoglykanen dosisabhängig stimuliert [112]. Gleichzeitig weist IGF-I einen inhibitorischen Effekt auf den Proteoglykan-Katabolismus auf [113]. Die Wirkungen von IGF werden durch die Bindung an den IGF-Rezeptor (IGF-R) vermittelt. Dieser weist ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Insulinrezeptor auf. Typ I IGF-Rezeptor (IGF-RI) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 300 kDa und besteht aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten (etwa 130 kDa) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten (etwa 90 kDa), verbunden durch Disulfidbrücken. Die  $\beta$ -Untereinheiten durchqueren die Zellmembran und beinhalten eine Tyrosinkinase-Domäne im zytoplasmatischen Teil. IGF-RI vermittelt die Wirkung von IGF-I wie auch von IGF-II. Die meisten Effekte von IGF-I und IGF-II werden dennoch durch den Typ I Rezeptor vermittelt [114].

Zell- und gewebsspezifische IGF-I-Bindungsproteine (IGFBPs) regulieren die Aktivität von IGF-I durch Modulation der Interaktion mit IGF-I-Rezeptoren. Sie wirken als Transportproteine und verlängern die Halbwertszeit von IGF-I. Mittlerweile kennt man sechs IGFBPs, von denen IGFBP-2, -3 und -6 im Knorpel nachgewiesen wurden [115]. Sie scheinen eher eine inhibitorische Rolle zu spielen. IGFBP-3 scheint als Speicherprotein für IGF-I in der extrazellulären Matrix zu fungieren. Im höheren Alter liegt IGFBP-3 in Ko-lokalisierung mit Fibronectin vor. Diese Kopräsenz erhöht die hemmende Funktion von IGFBP-3 in der extrazellulären Matrix [116].

IGF-I stimuliert die Matrixsynthese (Proteoglykane wie Aggrekan und Kollagen Typ II) der Chondrozyten mit geringem Effekt auf die mitotische Aktivität der Chondrozyten. Weiterhin steigert IGF-I auch die Adhäsion der Chondrozyten an spezifischen Matrixkomponenten [74]. In arthrotischem Knorpel konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem stimuliert IGF-I die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten-Vorläuferzellen [117] und fördert die Chondrogenese [103]. IGF-I stabilisiert den chondrozytenspezifischen Phänotyp, ohne eine terminale Differenzierung im hypertrophen Knorpel einzuleiten [103]. Auch in überphysiologischen Konzentrationen zum Beispiel 25  $\mu\text{g/ml}$  kommt es zur Matrixsynthesesteigerung, ohne dass schädliche Effekte auf die Knorpelzellen zu erkennen sind [109].

TGF- $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor, der in verschiedenen Geweben vorkommt und Zellwachstum, Differenzierung, Synthese extrazellulärer Matrixproteine und Apoptose beeinflusst [118]. TGF- $\beta$

stellt ein Makromolekül mit einem Molekulargewicht von 25 kDa dar. Es gehört zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Weitere Mitglieder sind neben drei Unterformen von TGF (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3), GDFs (Growth and Differentiation Factors) und BMPs. In humanem Gelenkknorpel werden die drei Isoformen von TGF- $\beta$  sezerniert [119]. TGF- $\beta$  wird von Chondrozyten und zahlreichen anderen Zelltypen selbst produziert. Es ist assoziiert mit dem «Latent TGF- $\beta$  Binding Protein» (LTBP). LTBP reguliert den Transport in die EZM sowie die hier erfolgende Speicherung von TGF- $\beta$  [102]. Kleine Proteoglykane wie Dekorin, Biglykan und Fibromodulin regulieren die Aktivität von TGF- $\beta$  durch Bindung in der EZM. Auch Kollagen Typ II scheint den Effekt von TGF- $\beta$  auf die Chondrozyten zu modulieren [102]. Eine relativ kurze Expositionszeit der Chondrozyten mit TGF- $\beta$ 1 ist ausreichend, um einen großen Effekt zu erzielen, da exogenes TGF- $\beta$ 1 die endogene Synthese von TGF- $\beta$ 1 und seinem Rezeptor über einen langen Zeitraum hochregulieren kann [103].

Die Signalwege von TGF- $\beta$  werden durch zwei Rezeptoren, TGF- $\beta$ -RI und TGF- $\beta$ -RII vermittelt. Diese bilden einen heterotetrameren Komplex und aktivieren mehrere Signalkaskaden. Beide Rezeptoren sind aus einer cysteinreichen extrazellulären Domäne, einer transmembranären Region und einer intrazellulären Kinasedomäne zusammengesetzt [120]. Zunächst bindet TGF- $\beta$  an den Typ II Rezeptor (TGF- $\beta$ -RII), wodurch der TGF- $\beta$ -RI rekrutiert und phosphoryliert wird. Durch diese Aktivierung phosphoryliert TGF- $\beta$ -RI rezeptorassoziierte Smad-Proteine (Smad2 und Smad3) [121]. Phosphoryliertes Smad2 und Smad3 bilden mit dem gemeinsamen Smad4 einen Komplex. Dieser transloziert in den Nukleus, um dort die Transkription zu regulieren [122]. Smads können ebenfalls durch verschiedene Mitglieder der MAPK Signalkaskade phosphoryliert werden. Dies kann sowohl zu einer Hemmung als auch zu einer Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalweges führen [123].

TGF- $\beta$ 1 und IGF-I regulieren synergistisch Proliferation und Differenzierung von periostalen Mesenchymzellen während der Chondrogenese. Fukumoto et al. konnten eine frühe Induktion der Chondrogenese durch TGF- $\beta$ 1 und eine Verstärkung durch IGF-I und damit Aufrechterhaltung der Zellproliferation zeigen [103]. TGF- $\beta$ 1 ist außerdem in der Lage die Expression der IGF-I-Rezeptoren zu fördern [124]. Beide Wachstumsfaktoren haben offenbar einen gegenläufigen Effekt auf die Apoptose der Zellen [118]. TGF- $\beta$  induziert einen Anstieg von IGFBP-3. Letzteres hemmt das Zellwachstum, indem es freies IGF-I bindet [118]. Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass die Kombination von beiden Wachstumsfaktoren synergistische Effekte im Sinne einer Induktion der Aggrekan und Kollagen Typ II mRNA auf dedifferenzierte humane Gelenkchondrozyten hat [125].

### 1.4.3. Wachstumsfaktoren im arthrotischen Knorpel

Im Rahmen der Pathogenese der Arthrose spielt vor allem das Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Mediatoren [126] eine entscheidende Rolle. Die Zusammensetzung der EZM ändert sich und die Chondrozyten weisen Dedifferenzierungsmerkmale auf [54]. TGF- $\beta$  ist ein wichtiger anaboler Faktor im Rahmen der Arthrose, da er einerseits sowohl die Synthese von Kollagen Typ II als auch von Proteoglykanen stimuliert und andererseits knorpelzerstörende Enzyme herabreguliert. Weiterhin ist TGF- $\beta$  in der Lage, der durch IL-1 induzierten Suppression von Proteoglykanen entgegenzuwirken [127]. Auf diese Weise ist TGF- $\beta$  fähig das Knorpelgewebe vor den Schäden durch IL-1 zu schützen. Dies ist jedoch nur in begrenztem Maße möglich. So konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass es nach IL-1-Exposition zu einer reduzierten Hemmung auf die IL-1-Wirkung durch TGF- $\beta$  kommt. Diese Ergebnisse weisen auf eine Veränderung im Antwortverhalten der Chondrozyten auf anabole und katabole Faktoren und somit auf einen Verlust der Homöostase des Knorpels bei Arthrose hin. Blaney Davidson et al. diskutieren eine Herabregulierung der Rezeptoren für TGF- $\beta$  und der Smads sowie einen Anstieg hemmender Smads als Ursache für die Abnahme des Antwortverhaltens der TGF- $\beta$  Entgegenwirkung von IL-1 im Mausmodell [128].

Im Rahmen von arthrotischen Prozessen im Gelenkknorpel kommt es zu einer erhöhten Expression und Produktion von IGF-I [129]. Gleichzeitig konnte allerdings auch hier ein vermindertes Antwortverhalten der Chondrozyten auf IGF-I gezeigt werden. Der Grund hierfür scheint zum einen eine erhöhte Konzentration an IGFBP, zum anderen ein Verlust an funktionellen Rezeptoren zu sein [130]. Es ist bekannt, dass zahlreiche Faktoren, so auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , die IGF-I-Sekretion im Rahmen der Arthrose beeinflussen. Durch diese Zytokine kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von IGF-I in arthrotischem Knorpel. Auch IGFBPs werden in größeren Mengen freigesetzt [108].

## 1.5. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)

### 1.5.1. Verfahren der ACT

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein hochdifferenziertes Gewebe mit einem beschränkten Reparaturpotential von Knorpelverletzungen. Traumatische Gelenkknorpelschäden führen deshalb zu Funktionseinbußen und können später sehr oft in Arthrose münden. Verschiedene klinische und experimentelle Versuche wurden unternommen, um die Heilung von Knorpeldefekten zu ermöglichen [131]. Kleinere Defekte, die den subchondralen Knochen nicht betreffen, weisen nur eine geringe Heilungsrate auf und resultieren meist in posttraumatischer

Arthrose [132]. Synovialzellen übernehmen die Reparaturprozesse und füllen den Knorpeldefekt mit bindegewebigen Fasern auf [133]. Im Unterschied dazu übernehmen in größeren Knorpeldefekten, die bis in den subchondralen Raum reichenden, pluripotenten Knochenmarkszellen die Rekonstruktion der Knorpeloberfläche [134].

Die derzeitige Therapie von arthrotisch verändertem Knorpel konzentriert sich vor allem auf antiinflammatorische Medikamente, die Injektion von Steroiden oder Hyaluronsäure in das Gelenk sowie chirurgische Interventionen vor allem im Rahmen des Gelenkersatzes. Da die konservative, pharmakologische Therapie keine ausreichenden Ergebnisse erzielt und die chirurgische Intervention mit hohen Infektionsrisiken verbunden ist, wurde nach Alternativen gesucht.

Die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) wurde erstmals 1987 bei Patienten mit Symptomen einer Gelenkknorpelläsion im Knie durchgeführt. In dieser Studie mit 23 Patienten wurden Knorpelproben aus gesunden Bereichen des Knies entnommen, isoliert und für 14 bis 21 Tage kultiviert. Anschließend wurden sie in den Knorpeldefekt injiziert und nach 36 Monaten die Ergebnisse evaluiert. Es ergaben sich exzellente bis gute Ergebnisse [135]. Zwischen 1987 und 2001 wurden mehr als 950 Patienten in Schweden mit Knieverletzungen mittels der ACT behandelt. Brittberg et al. beschreiben ein kontinuierliches Follow-up bei 213 ACT-behandelten Patienten. In dieser Studie wird über 84 bis 90 Prozent gute bis sehr gute Ergebnisse bei differenzierten Femordefekttypen nach zwei bis zehn Jahren Follow-up berichtet. Erste Versuche im Rahmen der Knorpeltransplantation wurden allerdings bereits in den 60er Jahren im Tierversuch durchgeführt. Es wurden autologe und heterologe Chondrozyten verwendet und in den Knorpeldefekt transplantiert. Hier proliferierten die Zellen und bildeten eine Knorpelmatrix, die den Defekt füllte [136].

In einem ersten Schritt wird zunächst eine Probe aus dem Knorpel des entsprechenden Patienten entnommen. Es schließt sich die Isolation der Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe durch Verdauung der extrazellulären Matrix an. Der wichtigste Schritt ist die Proliferation der gewonnenen Chondrozyten *in vitro* in der Monolayer-Kultur. Sind genügend Zellen vorhanden, werden diese pelletiert, um anschließend in den Knorpeldefekt reimplantiert zu werden. Die *in vitro* vermehrten Chondrozyten werden in den Defekt eingefüllt und dieser mit einem Periostlappen gedeckt. Diese Methode hat bisher gute Ergebnisse gezeigt [137].

Trotz der meist guten Resultate ergeben sich im Zusammenhang mit der herkömmlichen Methode der ACT einige Schwachstellen oder Probleme. Einerseits spielen Dedifferenzierungsprozesse, welchen die transplantierten Zellen unterliegen, eine wichtige Rolle für die Qualität des Transplantats. Grund hierfür ist die bereits während der Vermehrung der Zellen in der

Monolayer-Kultur stattfindende Dedifferenzierung, die sich auch nach Transplantation fortsetzen kann [138]. Andererseits kann es zu einer Transplantathypertrophie kommen, welche durch den oft zum Überdecken der transplantierten Chondrozyten verwendeten Periostlappen entstehen kann [139]. Der Periostlappen dient sowohl als mechanische Abdeckung als auch als Reparaturgewebe mit chondrogener Wirkung. So soll von implantierten Chondrozyten freigesetztes TGF- $\beta$  zu Chondrogenese von periostalen Zellen führen und somit zur Defektheilung [140]. Als Hypothese für die Periosthypertrophie kann mechanische Überreizung durch Reibung oder Stimulation durch überstehende Anteile angenommen werden [139].

#### 1.5.2. Dedifferenzierung und Redifferenzierung der Chondrozyten *in vitro*

Die Limitierung der isolierbaren Zellzahl aus dem Spendergewebe stellt eines der wesentlichsten Probleme der ACT dar, da eine ausreichende Menge an Chondrozyten für die ACT eine wesentliche Voraussetzung darstellt. Daher ist eine schnelle und suffiziente Vermehrung der Chondrozyten in größeren Mengen nötig. Diese ist nur in der Monolayer-Kultur möglich. Nach der Isolierung der Zellen aus dem Spendergewebe werden diese in Wachstumsmedium suspendiert in Zellkulturflaschen überführt. Bereits nach wenigen Stunden beginnen die Zellen zu adhären. Aus der ursprünglich runden Form flachen sie sich ab und bilden Zellausläufer aus. Mithilfe dieser Zytoplasmafortsätze adhären sie auf dem Boden der Kulturflaschen. Dies stellt den Beginn der Dedifferenzierung der Chondrozyten *in vitro* dar. Die Zellen verändern zunächst ihren Phänotyp, indem sie eine fibroblastenähnliche Gestalt annehmen (phänotypische Dedifferenzierung). Zusätzlich ändert sich auch ihr Syntheseverhalten. Um Chondrozyten effizient vermehren zu können, sind Passagierprozesse nötig. Je öfter die Zellen passagiert werden, umso weniger typische Knorpelmarker, wie knorpelspezifische Proteoglykane (CSPG) und Kollagen Typ II bilden sie. Stattdessen kommt es zu einer Umstellung auf die Produktion unspezifischer Proteoglykane sowie Kollagen Typ I [37]. Nach längerer Zeit in Monolayer-Kultur sinkt die Proliferationsrate stark ab und das chondrogene Potential der Zellen scheint irreversibel verloren zu sein [141].

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass dedifferenzierte Chondrozyten aus Monolayer-Kulturen der Passagen eins bis vier in der Lage waren zu redifferenzieren, nachdem sie in ein dreidimensionales Kultursystem überführt wurden [25]. Während der ersten bis zur vierten Passage scheint das chondrogene Potential der Chondrozyten demnach auszureichen um eine Redifferenzierung im dreidimensionalen Modell zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu redifferenzierten Chondrozyten aus Monolayer-Kulturen der Passage fünf und höher nicht,

sondern unterlagen apoptotischen Prozessen [25]. Diese Zellen sind demnach nicht nur phänotypisch sondern bereits auch genotypisch dedifferenziert.

### 1.5.3. Ansätze zur Verbesserung der ACT

Neben dem Problem einer ausreichenden vitalen Zellzahl, muss eine stabile und funktionelle Matrix gefunden werden, um die biologische Funktion und die mechanische Integration der Zellen in ihrer EZM *in vitro* aufrecht zu erhalten. Es gibt bereits zahlreiche Versuche mit unterschiedlichsten Matrizen, basierend auf Polyglykolsäure, Hyaluronester, polymerisiertem oder nicht polymerisiertem Fibrin, Kollagen, Alginat, Chitosan, Kalziumkarbonat sowie Kombinationen der genannten Substanzen. Unter Verwendung von Polyglykolsäure konnte nach 20 Tagen ein Knorpelgewebe mit einem hohen Widerstand gegenüber mechanischer Belastung kultiviert werden [142]. Problematisch erscheint jedoch die Bildung von toxischen Monomeren nach dem Abbau dieser resorbierbaren Polymere [143]. Eine Alternative könnten auf Hyaluron basierende Polymere darstellen. Diese unterstützen die Knorpelbildung aus Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen. Einen Vorteil stellt ihre Biokompatibilität dar. Außerdem adhären und proliferieren die Zellen auf diesem Material sehr gut [144]. In der Alginat-Kultur ist es den Chondrozyten möglich eine dreidimensionelle Matrix aufzubauen und diese über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. Somit stellt Alginat ein hervorragendes System dar, in dem *in vivo* Bedingungen für Chondrozyten sehr gut nachgestellt werden können. Matrizen, welche auf Kollagen basieren, stellen eine weitere Möglichkeit dar. Unter Verwendung von Kollagen Typ I proliferieren die Chondrozyten stärker als zum Beispiel in Alginat. Ein Problem stellt jedoch der sich nach und nach einstellende Verlust des differenzierten Phänotyps dar [145].

Eine wesentliche Rolle im Rahmen des Tissue-Engineering spielen außerdem die Kulturbedingungen und vor allem die Auswahl des Wachstumsmediums. Wichtiger Bestandteil ist Serum, zum Beispiel fetales Kälberserum (FCS), Neugeborenen Rinderserum (NBS), Pferdeserum oder menschliches Serum in Konzentrationen zwischen zwei und zwanzig Prozent [146]. Serum beinhaltet zahlreiche Wachstumsfaktoren und liefert somit die wesentlichen Faktoren für das Wachstum der Zellen. Die Anwendung von serumhaltigem Medium weist allerdings zahlreiche Probleme auf. So kann es zu immunologischen Reaktionen auf das implantierte Gewebe kommen. Weiterhin scheinen einige Wachstumsfaktoren toxische Wirkungen auf die Zellen zu haben [146]. Außerdem sind die Konzentrationen in den Wachstumsmedien nicht konstant und variieren, so dass die Bedingungen für ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen nicht gegeben sind. Aus diesen Gründen tendiert man immer mehr dazu, serumfreies Medium zur Proliferation der Zellen zu benutzen und stattdessen Wachstums-

faktoren in definierten Konzentrationen hinzuzufügen. Bruckner et al. konnten zeigen, dass die Kultur primärer Chondrozyten aus dem Sternum von Hühnerembryonen in serumfreiem Medium zu einer Aufrechterhaltung des Phänotyps und zu vitalen Zellen führte [20]. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie IGF-I führte zu einer deutlich erhöhten Proliferation von Chondrozyten, verglichen mit serumfreiem Medium allein [147].

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine gute Knorpelheilung ist die gute Integration des implantierten Gewebes in den umliegenden Knorpel. Ein Hauptbestandteil der EZM, die Proteoglykane, sind negativ geladene Proteine und erschweren somit die Anheftung der Zellen an ihrer Oberfläche [148]. Wichtig ist außerdem die Einheilung an den darunterliegenden Knochen. Den Knochen penetrierende Maßnahmen sollen dazu führen, dass mesenchymale Stammzellen in den Defekt vordringen und somit zur Defektheilung beitragen. Die Ausbildung einer intakten und regelmäßigen Oberfläche ist eines der wesentlichen Ziele, da diese dem Verlust von weiterem Knorpelgewebe vorbeugt.

Mit Hilfe von Wachstumsfaktoren könnte die Möglichkeit bestehen, den differenzierten Phänotyp von autologen Chondrozyten für die ACT zu stabilisieren. Eine im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass IGF-I in der Lage ist Dedifferenzierungsprozesse im Rahmen der Proliferation der Chondrozyten *in vitro* zu verzögern. Durch Bindung an seinen Rezeptor aktiviert IGF-I die Signalkette der MAPK. Es kommt zu einer Aktivierung von Erk 1/2, welches in Assoziation mit dem chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 steht. Auf diese Weise ist IGF-I in der Lage das chondrogene Potential der Zellen während der *in vitro* Phase zu verlängern. In Monolayer-Kultur bereits phänotypisch dedifferenzierte Chondrozyten waren somit in der Lage bis zur sechsten/siebten Passage nach Überführung in die Massenkultur zu redifferenzieren und knorpeltypische Eigenschaften wiederzuerlangen [77].

*Es wäre nützlich diese Technik soweit zu verbessern, dass auch größere und im Frühstadium der Arthrose entstandene Knorpeldefekte behandelbar werden.*

## 2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Arthrose ist die am weitesten verbreitete Gelenkerkrankung beim Menschen. Am häufigsten sind die großen, am stärksten belasteten Gelenke wie Knie- und Hüftgelenk betroffen. Im Verlauf der Arthrose weist der Knorpel Veränderungen wie eine Verringerung der Zellzahl (leere Knorpellakunen), Matrixverlust, Auffaserung und Aufweichung bestimmter Areale, Abrieb des Knorpels und Osteophytenbildung auf, so dass schließlich im Spätstadium der subchondrale Knochen zu Tage tritt. Arthrose entsteht aus einem multifaktoriellen Geschehen. Prädispositionen wie zunehmendes Alter, genetische Dispositionen führen zu einem instabilen Kollagennetzwerk. Bei Fehlbelastungen geraten die Chondrozyten in mechanischen Stress und reagieren mit der Produktion von Entzündungsmediatoren [44]. Von Synovialzellen, Makrophagen und Chondrozyten freigesetzte Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthrose [41]. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bewirken ein Absinken der Synthese von knorpelspezifischen Matrixproteinen wie Kollagen Typ II und Aggrecan [149]. Außerdem steigern sie die Synthese proinflammatorischer Enzyme wie Cyclooxygenase-2 (COX-2) und matrixabbauender Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören [52]. In arthrotischem Knorpel wird durch Zytokine die Sekretion zahlreicher MMPs (zum Beispiel MMP-1, -3, -8, -9 und -13) induziert [150]. Die COX-Produktion führt zur Bildung von Prostaglandin-E2. Andererseits bilden die Zellen vermehrt knorpelunspezifisches Kollagen (Typ I, III und V) [53]. Insgesamt entsteht also ein Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -abbau [126].

Gelenkknorpelverletzungen heilen normalerweise nicht oder nur unter günstigen Umständen. Traumatische Gelenkknorpelschäden führen deshalb zu Funktionseinbußen und münden sehr oft in Arthrose. Da der künstliche Gelenkersatz eine äußerst invasive und noch immer mit Komplikationen verbundene Methode zur Wiederherstellung der Funktionalität des Gelenkes ist, wird seit Jahrzehnten nach Alternativen geforscht. Verschiedene klinische und experimentelle Versuche wurden unternommen, um die Heilung von Knorpeldefekten zu ermöglichen [151]. So kommt seit einigen Jahren die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) zum Einsatz. Hierbei werden dem Patienten Chondrozyten entnommen und außerhalb des Körpers *in vitro* vermehrt, um in den Gelenkknorpeldefekt eingefüllt zu werden [152]. Die *in vitro* vermehrten Chondrozyten werden dann als Suspension in den Defekt eingefüllt und dieser mit einem Periostlappen gedeckt. Diese Methode hat bisher gute Ergebnisse gezeigt [139], sie weist allerdings Probleme auf. Während der Expansionsphase der Chondrozyten in der Monolayer-

Kultur kommt es zunächst zu phänotypischen Veränderungen der Zellen. Sie nehmen eine fibroblastenähnliche Gestalt an. Im weiteren Verlauf wird die Produktion von typischen extrazellulären Matrixbestandteilen wie Kollagen Typ II auf die Produktion von Kollagen Typ I umgestellt. Diese Dedifferenzierungsprozesse ergeben Zellen, die nicht in der Lage sind, einen bestehenden Knorpeldefekt funktionell zu ersetzen. Sie haben ihr chondrogenes Potential verloren.

Es muss also nach Möglichkeiten gesucht werden, eine ausreichende Anzahl an Chondrozyten *in vitro* zu gewinnen, das chondrogene Potential dieser Zellen aufrecht zu erhalten und somit Material zu gewinnen, welches im Rahmen der ACT Knorpeldefekte adäquat und funktionell decken kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren anabole Effekte auf die Differenzierungskapazität, das Wachstum und das Überleben von Chondrozyten haben. TGF- $\beta$  wird in normalem hyalinem Gelenkknorpel exprimiert und reguliert die Zellproliferation und die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile. IGF-I ist ein weiterer wichtiger anaboler Wachstumsfaktor. Es ist bekannt, dass IGF-I in der Lage ist, Differenzierungsprozesse sowie die Produktion von Matrixproteinen *in vivo* und *in vitro* zu stimulieren. Mit Hilfe von Wachstumsfaktoren könnte demnach die Möglichkeit bestehen, den differenzierten Phänotyp von autologen Chondrozyten für die ACT zu stabilisieren. Derzeit ist ihre Anwendung jedoch begrenzt auf die Behandlung kleinerer traumatisch entstandener Knorpeldefekte.

Deshalb sollten in dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Welchen Einfluss haben IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das Redifferenzierungspotential von dedifferenzierenden Chondrozyten?
2. Welchen Einfluss haben IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf den MAPKinase-Signalübertragungsweg in dedifferenzierenden Chondrozyten?
3. Interagieren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 induzierte Signalübertragungswege?
4. Besteht eine Knorpelbildung in einem dreidimensionalen Kulturmodell bei den redifferenzierten Chondrozyten nach der Behandlung mit Wachstumsfaktoren?

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten bei der Beurteilung helfen, ob eine Wachstumsfaktortherapie nützlich ist, um *in vitro* dedifferenzierende autologe Chondrozyten mit höherer Erfolgsrate zu redifferenzieren und in ihrem differenzierten Phänotyp zu stabilisieren. Langfristig könnten die Ergebnisse also zur Verbesserung der Chondrozytenkultivierung in Hinblick auf Arthrosetherapie und ACT genutzt werden.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. **Materialien**

Zellkulturflaschen, Petrischalen, Multiwell-Platten, Einfriercups, Zellschaber stammen von der Firma Nunc, Wiesbaden.

##### 3.1.1. Reagenzien

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), Ham's F-12 Medium, Hanks-Salz-Lösung, PBS Dulbecco, FCS (fetales Kälberserum), Penicillin/Streptomycin (10000 U/ 10000 µg/ml), Amphothericin B (250 µg/ml), essentielle Aminosäuren (MEM Amino Acids), L-Glutamin (200 mM) und Trypsin (Trypsin/ EDTA 0,05%/ 0,02% in PBS-Lösung) wurden von Biochrom, Berlin hergestellt; Vitamin C (L-Ascorbic Acid, 25µg/ml) von Sigma, München. Firma Merck, Darmstadt, lieferte Glucose. Alginat, BSA und Kollagenase (Clostridium histolyticum, 0,15IU/mg) stammen von Sigma, München; Pronase von Roche, Mannheim.

##### 3.1.2. Chemikalien und Antikörper

Tris-Base, Tris-HCL, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Glycin, 2-Mercapto-Ethanol stammen von Sigma, München. SDS (Sodium Dodecyle Sulfate), Acrylamid, Nitrocellulose und Tween 20 lieferte Bio-Rad, München. Magermilchpulver (Skim Milk Powder) wurde von Fluka, Buchs, hergestellt. Methanol, Ethanol, Aceton, DMSO (Dimethylsulfoxid), Methylenblau wurden von Merck, Darmstadt, erworben. Osmium, Epon und Uranylacetat/Bleicitrat stammen von Plano, Marburg.

#### Antikörper

- |                                  |                              |
|----------------------------------|------------------------------|
| - Anti- Kollagen Typ II          | Chemicon, Hofheim            |
| - Anti- β <sub>1</sub> -Integrin | Transduction, Lexington, USA |
| - Anti- Erk 1/2                  | Transduction, Lexington, USA |
| - Anti- Shc                      | Transduction, Lexington, USA |
| - Anti- MMP-9                    | R&D, Wiesbaden               |
| - Anti- MMP-13                   | R&D, Wiesbaden               |
| - Anti- Caspase-3                | R&D, Wiesbaden               |
| - Anti- β-Aktin                  | Sigma, München               |
| - Anti- CSPG                     | Sigma, München               |

- Anti- COX-2 Cayman, Michigan, USA
- Anti- Sox9 Acris, Hiddenhausen
- Sheep anti- rabbit IgG Chemicon, Temecula, USA
- Sheep anti- mouse IgG Chemicon, Temecula, USA
- Sekundäre Antikörper GAR (Gold gekoppelt 10nm), Amersham, Braunschweig
- Goat-anti-rabbit/or mouse-Fluorescein-Isothiocyanat, Dianova, Hamburg

#### Wachstumsfaktoren und Zytokine

- Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) Strathmann, Hamburg
- Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Pepro Tech, London, UK
- Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ 1) Pepro Tech, London, UK

### **3.2. Methoden**

#### 3.2.1. Gewinnung und Isolierung der humanen Chondrozyten

Die untersuchten humanen Chondrozyten entstammen dem Hüftgelenkshaupt und wurden im Rahmen des Gelenkersatzes operativ steril entnommen, in Transportmedium (Ham's F-12/DMEM) und auf Eis transportiert. Es folgten Spülvorgänge mit Hanks Salz-Lösung. Die Knorpelstücke wurden zerkleinert (drei bis fünf mm große Stückchen), Bindegewebe und Knochensplitter sorgfältig entfernt und erneut gespült. Es folgte der enzymatische Abbau: Zunächst die Inkubation mit 1%iger Pronase für anderthalb bis zwei Stunden im Schüttelwasserbad bei 37°C und erneutes Spülen. Anschließend wurde für anderthalb bis vier Stunden mit Kollagenase (0,2%) inkubiert. Die entstandene Suspension wurde nun zwei mal durch einen Polyamid-Gazefilter PA100/31 filtriert und anschließend bei 1000-1200 U/min fünf Minuten im Rundröhrchen zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach wiederholtem Spülen, nochmaliger Zentrifugation und Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer in zwei bis 2,5%iges Alginat überführt.

##### 3.2.1.1. Alginat-Kultur

Das 2,5%ige Alginat wurde zunächst in 0,15 M NaCl ein bis zwei Stunden auf einer Rührplatte gerührt, um im Anschluss steril filtriert zu werden. Das zuvor gewonnene Zellpellet wurde eingerührt und allmählich tropfenförmig in eine 100 mM CaCl<sub>2</sub> gegeben. Hier polymerisierten die Alginatropfenchen. Nach Spülen mit Wachstumsmedium (Ham'F-12/ DMEM) erfolgte die Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und fünf Prozent CO<sub>2</sub>. Die nach ein paar Tagen aus dem Zentrum des Alginats emigrierten Zellen [153] wiesen den typischen Phänotyp von

Chondrozyten auf, das heißt runde bis ovale Zellen, und sie produzierten, wie in vorangegangenen Studien bereits nachgewiesen werden konnte, das knorpelspezifische Matrixprotein Kollagen Typ II [25,78]. Keine der Zellen erschien fibroblastenähnlich, weder morphologisch noch aus molekularbiologischer Sicht, da sie kein für Fibroblasten typisches Matrixprotein Kollagen Typ I produzierten [25,78]. Man kann die Alginat-Kultur als Filterstation betrachten, die eine reine Chondrozytenkultur liefert, da fibroblastenähnliche Zellen im Alginat nicht überleben [154]. Sie bietet den primären Chondrozyten außerdem dreidimensionale Kulturbedingungen, ähnlich der Situation *in vivo*. Desweiteren stellt sie ein Reservoir primärer Zellen dar, die monatelang verfügbar sind.

#### 3.2.1.2. Chondrozyten in Monolayer-Kultur

Die aus dem Alginat emigrierten Chondrozyten adhärten an der Oberfläche der Zellkulturflaschen und bildeten einen Monolayer aus [153]. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Chondrozyten durch Trypsin abgelöst und in neuen Passagen weiter vermehrt oder für andere Untersuchungen in Massenkultur überführt. Die Kulturbedingungen beinhalteten eine Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> und eine Temperatur von 37°C.

#### 3.2.1.3. Massenkultur

Zum Anlegen einer Massenkultur benötigt man eine sterile Drahtbrücke mit einem sterilen Filter. Beides wurde in eine mittlere Petrischale platziert. Anschließend wurde ein 10 µl großes Zellpellet aus humanen emigrierten Chondrozyten (1 x 10<sup>6</sup>/ml) auf den Filter an einer Medium-Luft Grenze gesetzt. Die hohe Zelldichte bietet dabei den Zellen die Möglichkeit intensive Zell-Zell-Kontakte und somit *in vivo* ähnliche organoide Strukturen auszubilden. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Die Massenkultur wurde für sieben Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 3.2.2. Stimulation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur

Die Chondrozyten in Monolayer wurden zunächst auf serumfreien Medium (0,5%) umgestellt. Hierzu erfolgte dreimaliges spülen mit 0,5%igem Medium und eine Inkubation für eine halbe Stunde im Brutschrank. Die Zellen wurden zunächst mit IL-1β (10 ng/ml) für 24 Stunden vorstimuliert, gefolgt von der Ko-Behandlung mit IL-1β (10 ng/ml) und IGF-I (100 ng/ml) oder TGF-β1 (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Auch hier wurde das Medium alle 24 Stunden gewechselt. Ein weiterer Ansatz war die kombinierte Inkubation nach 24 Stunden mit IGF-I und TGF-β1 für weitere 48 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 100 ng/ml). Die

Chondrozyten wurden nach 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden entnommen und für Westernblot Analyse, Elektronenmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz präpariert.

#### 3.2.2.1. Stimulation der Chondrozyten mit Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

In einem ersten Versuch wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer zunächst drei mal mit serumfreien Medium (0,5%) gespült und erneut für eine halbe Stunde in den Brutschrank gestellt. Es folgte die Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72 Stunden. Das Stimulationsmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt und die Zellen wurden nach 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden entnommen.

#### 3.2.2.2. Stimulation der Chondrozyten mit Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) oder Transforming Growth Factor beta1 (TGF- $\beta$ 1)

Im zweiten Versuch wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer zunächst drei mal mit serumfreien Medium (0,5%) gespült und erneut für eine halbe Stunde in den Brutschrank gestellt. Es folgte die Vorstimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24 Stunden und im Anschluss die Ko-Behandlung mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I (100 ng/ml) oder TGF- $\beta$ 1 (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Auch hier wurde das Medium alle 24 Stunden gewechselt.

#### 3.2.2.3. Stimulation der Chondrozyten mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Kombination

In einem dritten Versuch wurden die emigrierten Chondrozyten für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert gefolgt von der Ko-Behandlung mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 100 ng/ml).

#### 3.2.3. Stimulation der Chondrozyten in Massenkultur

In einem weiteren Versuch wurde der isolierte Effekt von IGF-I *oder* TGF- $\beta$ 1 und der kombinierte Effekt von IGF-I *und* TGF- $\beta$ 1 auf das Redifferenzierungsverhalten von emigrierten Chondrozyten in einem dreidimensionalen Modell (Massenkultur, mit der wir gute Erfahrung haben) geprüft. Die Zellen wurden in Monolayer-Kultur gezüchtet und mit Wachstumsfaktoren ko-stimuliert und nach einer Inkubationszeit von 0, 12, 24 und 48 Stunden für weitere sieben Tage in Massenkulturen überführt. Für die Redifferenzierung im 3D-System wurde die Massenkultur ausgewählt, weil sie die Verhältnisse der Chondrogenese *in vitro* nachstellt [24]. Außerdem hat sie sich in Vorversuchen zur Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondro-

zyten bereits bewährt [25]. Für die Versuche wurden die Monolayer-Kulturen 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  vorstimuliert, um anschließend mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 (100 ng/ml) oder IGF-I (100 ng/ml) oder kombiniert (je 10 ng/ml) für 24 Stunden ko-stimuliert zu werden. Diese kurze Stimulation reicht vermutlich aus, da durch exogene Gabe von bestimmten Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  deren endogene Synthese angeregt werden kann [155].

Am siebten Kulturtag wurden die Massenkulturen entnommen und für die immunhistochemische (Immunfluoreszenzmikroskopie), immunchemische (Westernblot) oder (immun-) elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet. Diese Methoden sind ausführlich bei Shakibaei et al., [62,74] und Schulze-Tanzil et al., [25,78] beschrieben.

#### 3.2.4. Westernblot Analyse

Nach der Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank, wurden diese zunächst mit HANKS gespült und im Anschluss mit Lysismix versetzt (Lysispuffer, PMSF und Pepstatin) und auf Eis für 30 Minuten inkubiert, wobei nach 15 Minuten mit einer Pipette homogenisiert wurde. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube überführt und 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde nun in ein neues Tube überführt und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde verworfen. Es schloss sich die Bestimmung der Proteinkonzentrationen, das Reduzieren und Einstellen der Proben an.

Die Proteinproben wurden anschließend auf fünf bis zwölf prozentigen SDS-Polyacrylamidgelen und einem 4%igen Sammelgel unter 80 beziehungsweise 120 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte der Transfer der Proben auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Transblot-Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München) für eine Stunde bei 120 Volt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen im Anschluss für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blocking Puffer (Skim milk mit 1% Tween 20) überführt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch dreimaliges Spülen mit Blocking Puffer entfernt und die Membranen für eine Stunde auf einem Schüttler mit dem Sekundär-antikörper inkubiert. Dieser wurde durch dreifaches Spülen mit Trispuffer entfernt. Es folgte der Nachweis der spezifischen Bindungen durch Zugabe von BCIP/NBT Solution als Entwickler in abgedunkelter Umgebung.

#### 3.2.5. Densitometrie

Die semiquantitative Auswertung der Ergebnisse des Immunoblottings erfolgte über die Densitometrie mittels Computer durch Ausmessung der Intensität der durch die Antikörper markierten Proteinbanden (Quantity one, Bio-Rad Laboratories Inc. CA, USA).

### 3.2.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die gespülten Zellen wurden für 30 Minuten mit Karnovsky bedeckt, anschließend mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und bei 5000 Umdrehungen für circa 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit einer 1% igen Osmium-(OsO<sub>4</sub>)Lösung in Phosphatpuffer fixiert und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Es folgte die Einbettung in Epon und das Schneiden mit dem Ultramikrotom Ultracut E (Reichert, Heidelberg). Die Schnitte wurden mit 2%igem Uranylacetat nachkontrastiert und schließlich mit dem Zeiss EM 10 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

### 3.2.7. Immunelektronenmikroskopie

Die entnommenen Zellen wurden zwei mal circa drei Minuten mit PBS gespült, um anschließend für 30 Minuten mit jeweils vier Milliliter Paraformaldehyd 3%/ Glutaraldehyd 0,25% bedeckt zu werden. Ein steriler Zellschaber wurde benutzt, um die Zellen abzuschaben. Mit einer Pipette wurden die fixierten Zellen in Eppendorfcups überführt. Nun wurden die Cups für circa fünf Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Einem erneuten Spülvorgang mit PBS schloss sich die Suspension der Proben in etwa 200 Mikroliter PBS an. Diese wurde abermals zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellpellets in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Einbettung der Proben bediente man sich zunächst eines Gemisches aus LR White und Ethanol im Verhältnis 50 zu 50, welches nach einem Tag und zweifachem Wechseln durch pures LR White ersetzt wurde. Zur entgeltigen Einbettung wurden die Pellets in Spezialcups überführt (auf Eis) und nun LR White mit Zusatz eines Accelerators hinzugegeben. Die polymerisierten Proben wurden über Nacht im Gefrierschrank gelagert und am nächsten Tag aus den Cups befreit, getrocknet und anschließend ultradünn geschnitten. Folgende weitere Prozesse schlossen sich an: (1) 1% BSA bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten; (2) testikuläre Chondroitinase (5000 U/ml) für 5 Minuten bei RT zum Freilegen von Epitopen; (3) PBS/1% BSA/0,5% Tween20 5 Minuten bei RT; (4) Primärer Antikörper (1:50 in PBS/1% BSA/0,5% Tween 20) über Nacht bei 4°C; (5) PBS/BSA/Tween for 5 Minuten bei RT; (6) sekundärer Antikörper mit goat anti-rabbit Immunoglobulin mit 10 nm Gold Partikeln (1:50 für 30 Minuten) konjugiert bei RT; (7) nach Spülen für 5 Minuten bei RT; (8) Kontrastieren mit 1% tannic acid für 20 Minuten bei RT, mit OsO<sub>4</sub> für 10 min und mit 2% Uranylacetat für 30 Minuten. Schließlich wurden die Schnitte gespült unter dem TEM 10 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Germany) untersucht.

### 3.2.8. Immunfluoreszenz

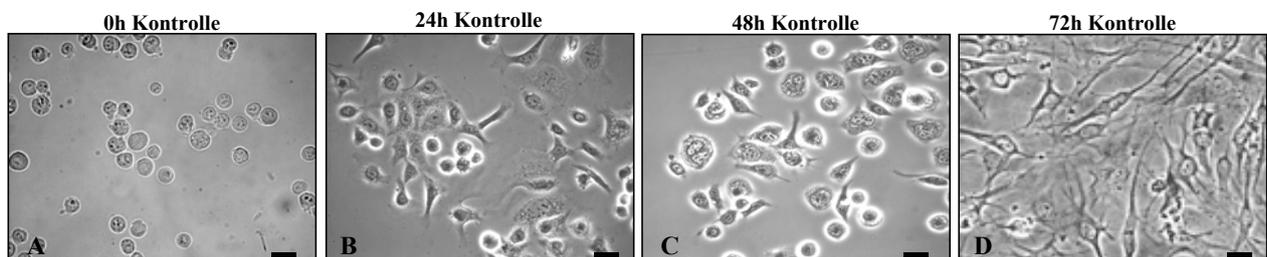
Die entnommenen Zellen wurden zunächst dreimal mit Phosphatpuffer (PBS) gespült, im Anschluss für ca. 20 bis 30 Minuten in Methanol fixiert und erneut gespült. Während des Blockens unspezifischer Bindungen mit einprozentigem Bovinen Serumalbumin (BSA) zur Vermeidung von störendem Hintergrund wurde der primäre Antikörper vorbereitet. Die Verdünnung betrug entweder eins zu dreißig oder eins zu fünfzig. Es wurde über Nacht und bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst drei mal mit PBS gespült, anschließend der sekundäre Antikörper (FITC) eins zu fünfzig verdünnt und für 60 Minuten im Dunklen inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS konnten die Objektträger eingedeckelt und mikroskopiert werden.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Kultivierung der Chondrozyten in Monolayer-Kultur

#### 4.1.1. Lichtmikroskopie

Die Kultivierung von Chondrozyten in der Monolayer-Kultur ist eine gängige Methode, um Chondrozyten *in vitro* zu züchten. Ähnlich primären Chondrozyten, änderten aus dem Alginat emigrierte Zellen während der Monolayer-Kultur zeitabhängig ihren Phänotyp: Frisch aus den Alginatkügelchen emigrierte Chondrozyten zeigten einen typischen runden, gedrunenen chondrogenen Phänotyp (Abb. 1A). Nach einigen Stunden begannen die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche zu adhären (Abb. 1B). Damit einhergehend flachten sie ab, streckten sich und bildeten zytoplasmatische Fortsätze aus. Im weiteren Verlauf der Monolayer-Kultur suchten die Zellen aktiv über ihre zytoplasmatischen Fortsätze Kontakt zu anderen Chondrozyten in der Kultur (Abb. 1B,C). Nach 72 Stunden in Monolayer-Kultur kam es zu einer deutlichen Proliferation der Chondrozyten, die zu einem Überwuchern der Zellen führte (Abb. 1 D). Die Zellmorphologie zeigte vermehrt spindelförmige Chondrozyten mit weitreichenden zytoplasmatischen Fortsätzen und einer mehr und mehr fibroblastenähnlichen Morphologie (Abb. 1D).



**Abb. 1:** Lichtmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach 0h, 24h, 48h und 72h. A-D: 200x; Bars = 25 µm

#### 4.1.2. Elektronenmikroskopie

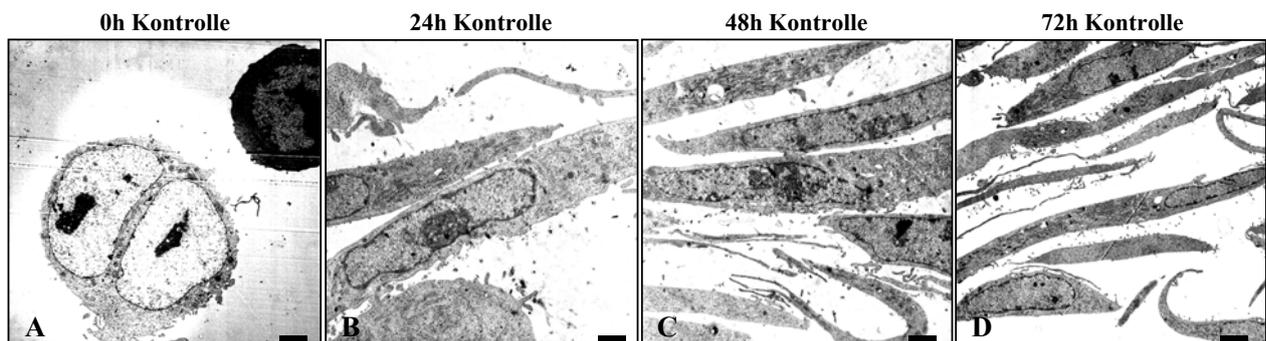
In elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellten sich humane aus dem Alginat emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur folgendermaßen dar (Abb.2):

Frisch adhärierte Zellen zeigten einen kompakten und gedrunenen Zellkörper mit zahlreichen Mikrovilli auf der Zelloberfläche, welche der Oberflächenvergrößerung und somit dem regen Austausch von Stoffen wie auch der interzellulären Kommunikation dienen (Abb. 2A). Im Zytoplasma der Chondrozyten waren zahlreiche Mitochondrien mit strukturierten Christae, viel

raues Endoplasmatisches Retikulum (rER), Golgi-Apparate sowie riesige Zellkerne mit großen Nukleoli und einem dominierenden Anteil an Euchromatin nachweisbar. Weiterhin waren viele Endo- und Exozytosevesikel erkennbar, welche mit Clathrin ausgekleidet sind und speziell der Exozytose dienen. Dies Alles weist auf einen hochaktiven Stoffwechsel hin wie man ihn nur bei vitalen und produktiven Zellen findet.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung der emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur konnte elektronenmikroskopisch die Veränderung der chondrogenen Zellmorphologie hin zu langgestreckten, spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Zellen deutlich beobachtet werden (Abb. 2D). Die Zellen blieben jedoch äußerst stoffwechselaktiv und wiesen die oben beschriebenen Zellorganellen und deutliche Mengen an Euchromatin auf.

Sobald die emigrierten Chondrozyten adhärirt waren, bildeten sie extrazelluläre Matrixproteine, die sich als feiner perizellulärer Saum darstellten. Anhand von immun-elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass es sich hierbei um Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane handelte (kein Bild).



**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach 0h, 24h, 48h und 72h. A-D: 5000x; Bars = 1 µm

## 4.2. Wirkung von IL-1 $\beta$ auf emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur

### 4.2.1. Elektronenmikroskopie

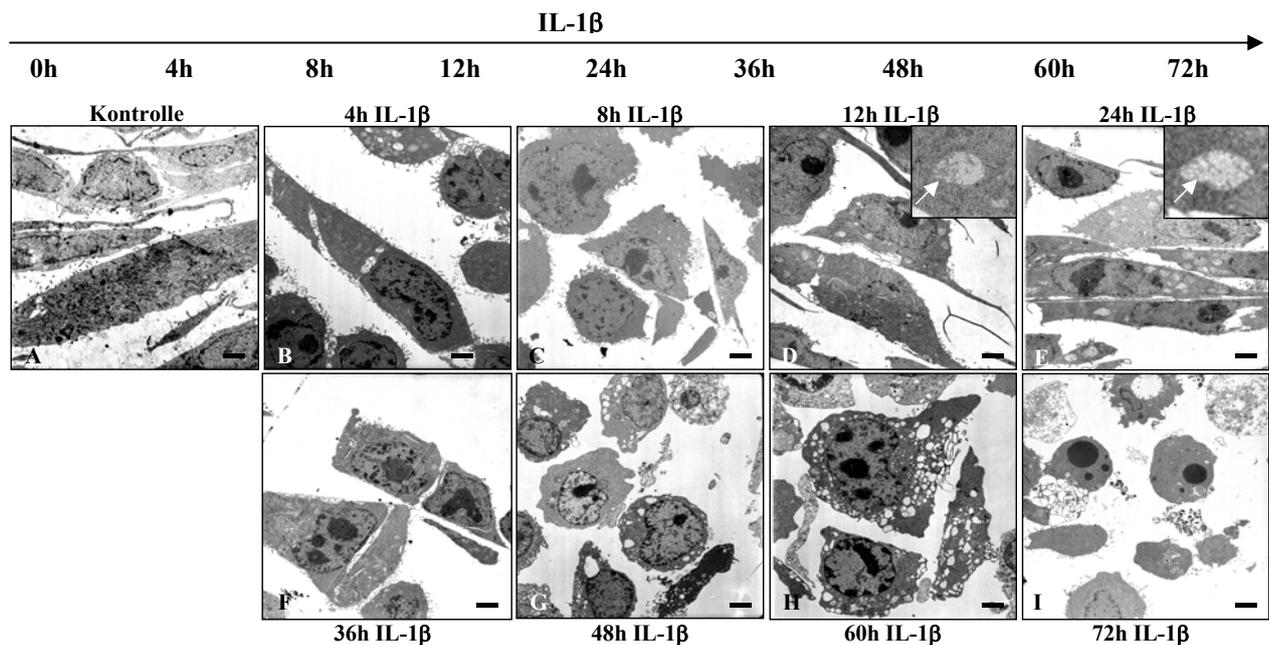
Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung knorpeldegenerativer Erkrankungen wie zum Beispiel der Arthrose. Daher wurden zunächst die Auswirkungen von IL-1 $\beta$ , als Vertreter der proinflammatorischen Zytokine im Knorpel, auf emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur untersucht. Dabei wurden die Chondrozyten 72 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und nach

4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden zunächst auf ultrastrukturelle Veränderungen mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3).

Bei nicht mit IL-1 $\beta$  stimulierten Chondrozyten (Positivkontrolle) wurde der typische chondrogene Phänotyp beobachtet: Polygonale Zellen mit zahlreichen Mikrovilli, einem euchromatinreichen Zellkern und einem feinen perizellulären Saum extrazellulärer Matrixproteine (Abb. 3A).

Bereits nach einer vierstündigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  traten erste phänotypische Veränderungen an den Chondrozyten auf: Die Zellen rundeten sich zunehmend ab und wiesen, zwar noch größtenteils sichtbare, aber deutlich veränderte Zellorganellen auf. Die Mitochondrien schwellen an, die klare Christastruktur wirkte angegriffen und im Zellkern reicherte sich vermehrt Heterochromatin an (Abb. 3B). Nach zwölfstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation waren die meisten Zellen deutlich abgerundet. Das rER war deutlich angeschwollen und wies keine regelmäßigen Zysternen mehr auf. Die geschwellenen, stark aufgehellten Mitochondrien hoben sich nun deutlich vom dunklen Zytoplasma ab (Abb. 3D; Inset). Diese Hyperaktivität der Mitochondrien und des rER konnten auch nach 24h mit IL-1 $\beta$ -Stimulation beobachtet werden, gleichzeitig wurden nun aber degenerative Veränderungen deutlich (Abb. 3E; Inset). Die Mitochondrien rundeten sich weiter ab und ihre Christastruktur veränderte sich dahingehend, dass viele gebrochene Christae sichtbar wurden. Desweiteren stieg der Anteil des Heterochromatins im Zellkern nun deutlich an, die Anzahl der Mikrovilli auf der Zellmembran reduzierte sich und die Golgi-Apparate streckten sich. Nach 36-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  zeigten sich überwiegend kleine, deutlich abgerundete Zellen, die erste Anzeichen einer beginnenden Apoptose in Form von Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“) aufwiesen (Abb. 3F). Die degenerativen Prozesse verstärkten sich weiter und führten zu einer kontinuierlichen Zunahme apoptotischer Prozesse nach 48 Stunden (Abb. 3G). Das Bild wurde nun von vermehrt auftretenden zytoplasmatischen Vesikeln, sich vom Zytoplasma lösender Zellkerne und lysierten Zellen dominiert. Nach 60-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  waren keine intakten Mitochondrien mehr sichtbar, die Christastrukturen waren vollständig zerstört. Im Gesamtbild waren verschiedene Stadien der späten Apoptose erkennbar. Besonders auffällig war die Zunahme zytoplasmatischer Vesikel und lysierter Zellen (Abb. 3H). Nach 72 Stunden IL-1 $\beta$ -Stimulation überwog die Zahl lysierter Zellen. Strukturell noch intakte Zellen wiesen alle Anzeichen einer fortgeschrittenen Apoptose auf und standen somit kurz vor der Lyse oder unterlagen diesem Prozess bereits (Abb. 3I).

Die Zellen wurden folgendermaßen stimuliert:



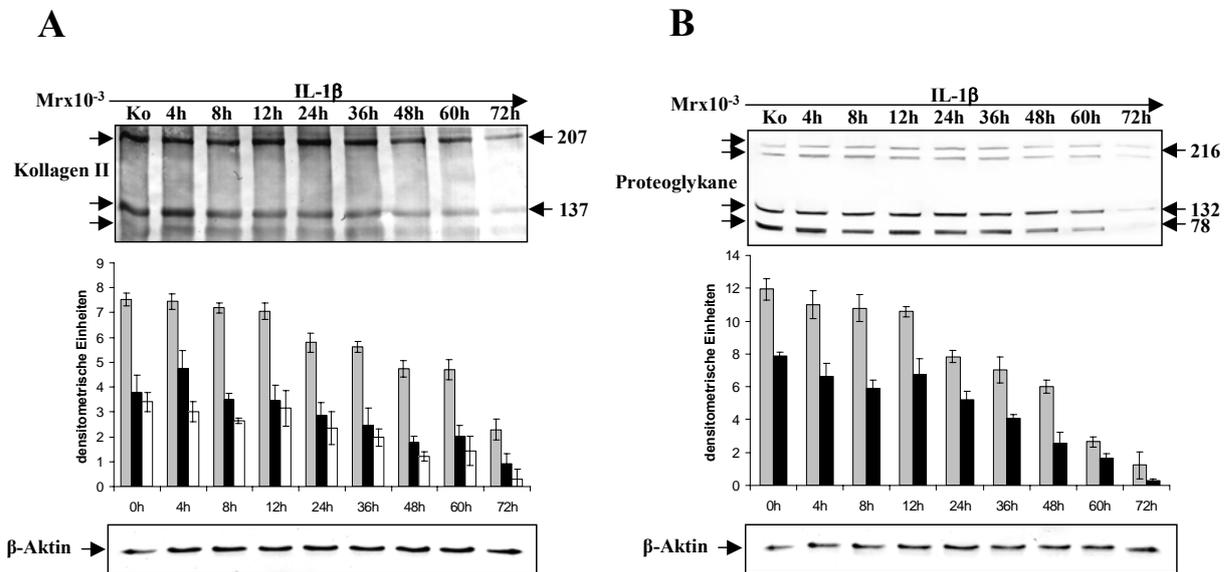
**Abb. 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h. Insets zeigen geschwollene Mitochondrien (D,E Pfeile). A-I: 5000x; Bars = 1  $\mu$ m

#### 4.2.2. Westernblot Analyse

Zusätzlich zu den im Elektronenmikroskop gefundenen morphologischen Veränderungen in den IL-1 $\beta$ -stimulierten Chondrozyten wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, auch auf Proteinebene mögliche Veränderungen in den Chondrozyten durch IL-1 $\beta$ -Stimulation zu untersuchen. Die emigrierten Chondrozyten wurden, wie oben beschrieben, 72 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und nach 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Proben entnommen. Zunächst wurden extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane), der Adhäsions- und Signalübertragungsrezeptor  $\beta_1$ -Integrin, das Adaptorprotein Shc (src homology Protein), Erk 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2) und der chondrogene Transkriptionsfaktor Sox9 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche, zeitabhängige Abnahme der Produktion der beiden wichtigen EZM-Bestandteile, Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane, durch Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation war eine Abnahme sowohl der Kollagen Typ II-Produktion (Abb. 4A) wie auch der Produktion knorpelspezifischer Proteoglykane (Abb. 4B) sichtbar, die nach 48-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation noch deutlicher wurde. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  über 72 Stunden führte zu einem drastischen Rückgang

sowohl der Kollagen Typ II-Produktion wie auch der Produktion knorpelspezifischer Proteoglykane. Die densitometrischen Auswertungen der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigten dies (Abb. 4). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

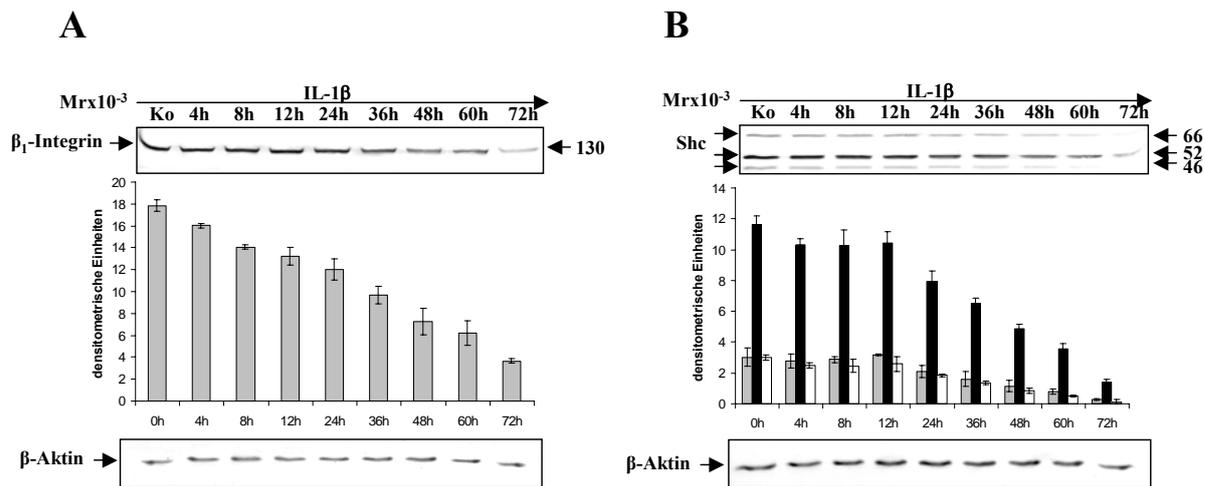


**Abb. 4:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h; deutliche Abnahme der Expression von Kollagen Typ II (A) und knorpelspezifischen Proteoglykanen (B); bei Proteoglykanen wurden exemplarisch die unteren zwei Banden gemessen (B).

Die Gruppe der Integrine vermitteln Zell-Matrix- und Zell-Zell-Signale und spielen somit bei der Adhäsion als auch der intrazellulären Signalübertragung eine wichtige Rolle. Sie stellen auch im Knorpel die wichtigsten Transmembranrezeptoren zur Interaktion der Chondrozyten mit ihrer sie umgebenden EZM und mit benachbarten Zellen dar. Nach wie oben beschriebener IL-1 $\beta$  Stimulation der Chondrozyten kam es zu einer deutlichen Abnahme der Expression von  $\beta_1$ -Integrin (Abb. 5A). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die  $\beta_1$ -Integrin-Abnahme bereits nach vierstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation signifikant war (Abb. 5A). Die kontinuierliche Abnahme der  $\beta_1$ -Integrin-Konzentration führte nach 72-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  dazu, dass die  $\beta_1$ -Integrin-Menge um das zehnfache reduziert war. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst (Abb. 5A).

Das Adaptorprotein Shc spielt eine wichtige Rolle als intrazellulärer Signalvermittler und steht am Anfang verschiedener Signalkaskaden unter anderem auch des MAPKinase Signalübertragungsweges. Nach wie oben beschriebener IL-1 $\beta$ -Stimulation der Chondrozyten

kam es zu einer deutlichen Abnahme der Shc-Expression (Abb. 5B). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Abnahme der Shc-Expression bereits nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation signifikant war (Abb. 5B). Die kontinuierliche Abnahme der Shc-Expression führte nach 72-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation dazu, dass die Expression von Shc um das siebenfache reduziert war. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

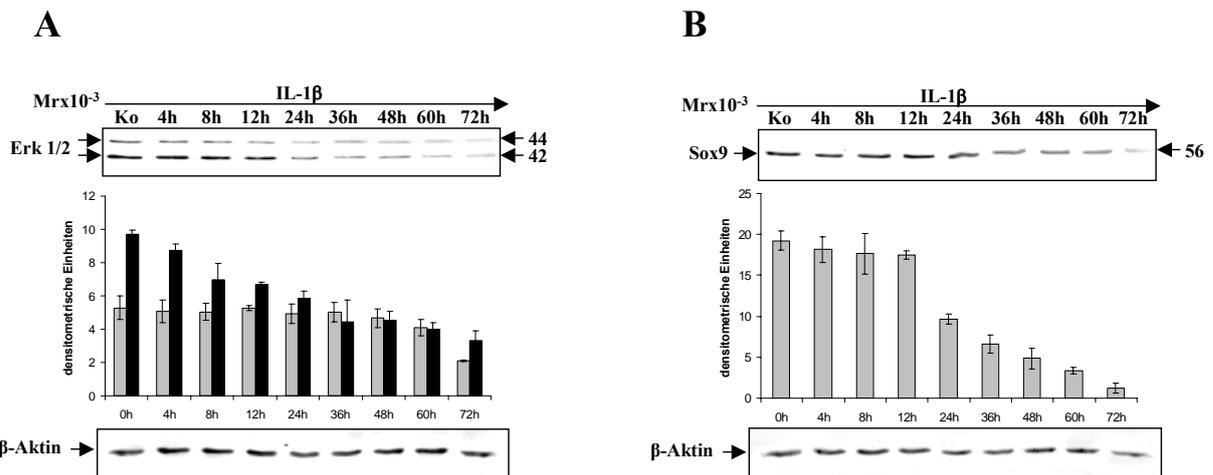


**Abb. 5:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h; deutliche Abnahme der Expression von  $\beta_1$ -Integrin (A) und Shc (B).

Eine Signalübertragungskaskade, welche besonders bei der Chondrogenese eine wichtige Rolle spielt, ist der MAPKinase Signalübertragungsweg. Wichtigster Vertreter, um eine Aktivierung dieses Signalübertragungsweges zu untersuchen, ist Erk 1/2 (extracellular regulated kinase 1 und 2). Nach wie oben ausführlich beschriebener zeitabhängiger Stimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  konnte eine deutliche Abnahme aktivierter Erk 1/2 beobachtet werden (Abb. 6A). Bereits nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  kam es zu einer signifikanten Abnahme aktivierter Erk 1/2, wobei hier die Isoform mit 42 kD (Erk 2) stärker betroffen war als die 44 kD Isoform. Nach 72 Stunden Stimulation mit IL-1 $\beta$  war nur noch eine minimale Bande im Westernblot nachweisbar. Die densitometrische Analyse bestätigte diesen Befund. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

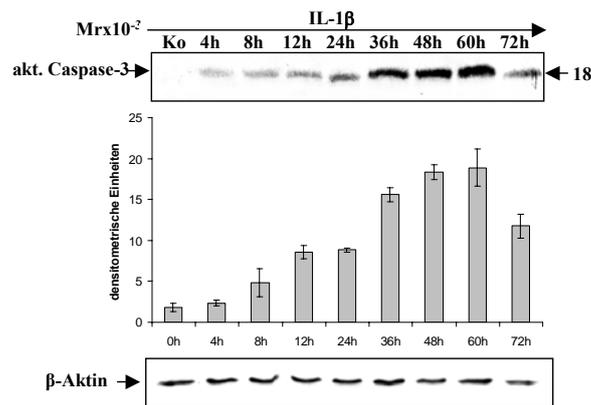
Den wichtigsten chondrogenen Transkriptionsfaktor stellt Sox9 dar. Eine Aktivierung von Sox9 im Zytoplasma führt zu einer Translokation in den Zellkern und somit zu einer Aktivierung besonders für die Chondrogenese wichtiger Gene, wie zum Beispiel zur Genexpression des Kollagen Typ II Genes. Nach wie oben beschriebener IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde eine deutliche, zeitabhängig abnehmende Konzentration von Sox9 gemessen (Abb. 6B). Die Sox9-Abnahme

war bereits nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  erkennbar. Eine signifikante Abnahme auf weniger als die Hälfte konnte nach 24 Stunden beobachtet werden. Am Ende der 72-stündigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  war nur noch ein zwanzigstel der ursprünglichen Konzentration vorhanden. Die densitometrische Analyse bestätigte diesen Befund. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 6:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h; deutliche Abnahme der Expression von Erk 1/2 (A) und Sox9 (B).

Da Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutliche Apoptosemerkmale in den mit IL-1 $\beta$ -stimulierten Zellen beobachtet werden konnten, wurden mittels Westernblot Analyse Konzentrationsveränderungen wichtiger mit degenerativen und apoptotischen Prozessen assoziierte Proteine untersucht. Wichtige, die Apoptose vermittelnde Enzyme stellt die Gruppe der Caspasen, besonders Caspase-3, dar. Nach wie oben beschriebener IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde eine deutliche, zeitabhängige Zunahme aktivierter Caspase-3 gemessen (Abb. 7). Diese Zunahme war am stärksten nach 60-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$  und nahm dann wieder leicht ab. Die densitometrische Analyse der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diesen Befund. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

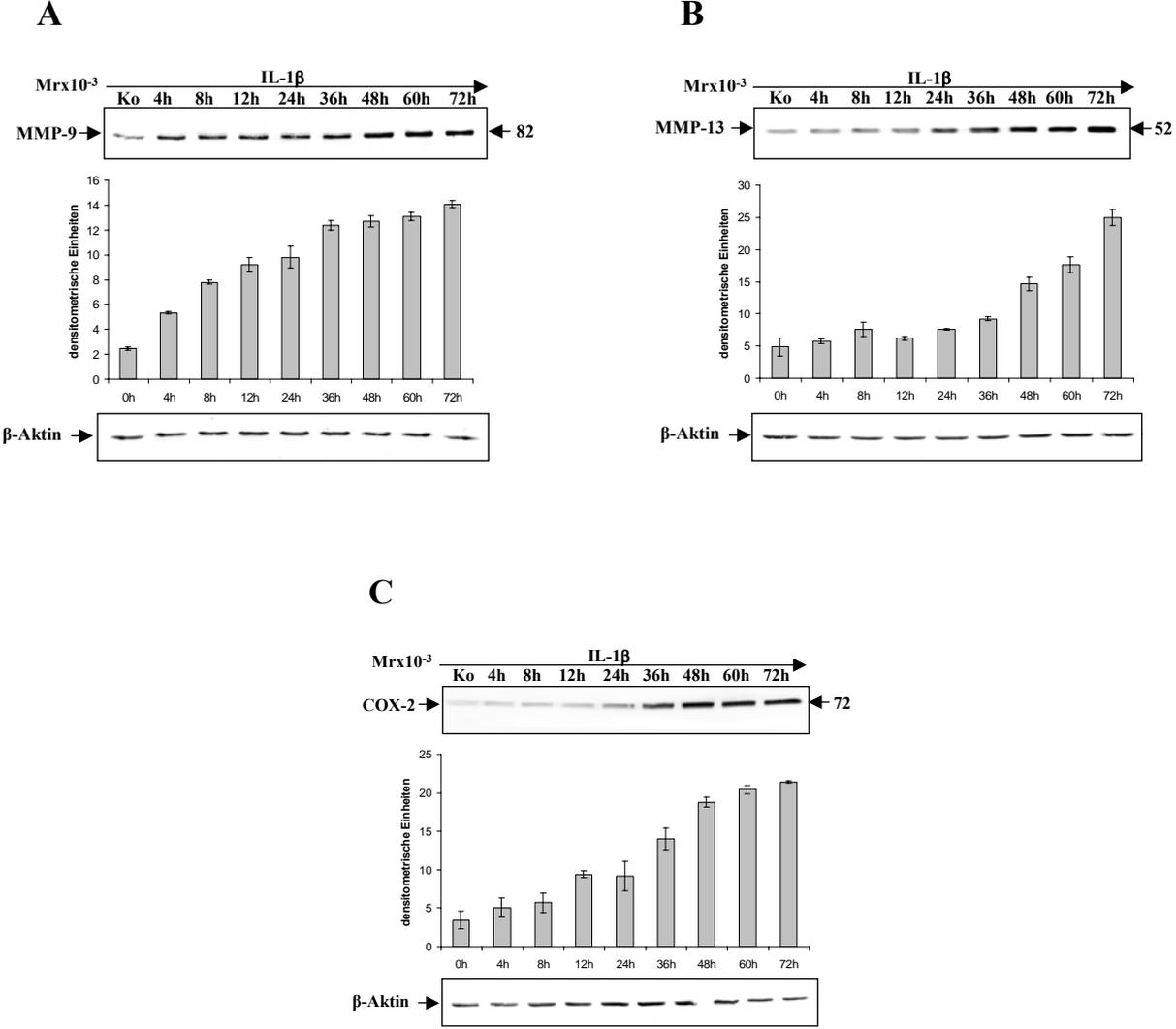


**Abb. 7:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h; deutliche Zunahme der Expression von aktivierter Caspase-3.

Eine wichtige Rolle bei knorpelapoptischen und degenerativen Prozessen spielen außerdem die Matrix-abbauenden Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Nach wie oben beschriebener Stimulation mit IL-1 $\beta$  wurde eine deutliche, zeitabhängige Zunahme von MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-13 (Kollagenase 3) gemessen (Abb. 8A,B). Bereits nach vierstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es bei MMP-9 zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg um das Doppelte (Abb. 8A). Nach 36-stündiger Stimulation konnte eine weitere deutliche Zunahme von MMP-9 vermerkt werden. Diese blieb bis zum Ende der 72-stündigen Inkubationszeit erhalten. In unstimulierten Chondrozyten konnte bereits eine geringfügige MMP-13-Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 8B). Allerdings kam es auch bei diesem Protein zu einer signifikanten Konzentrationszunahme nach 36-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation. Die deutlichste Bande, und somit die stärkste Konzentrationszunahme, wurde nach 72-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation beobachtet. Die densitometrische Analyse der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Befunde sowohl für MMP-9 als auch für MMP-13. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Im Rahmen arthrotisch degenerativer Prozesse kommt es weiterhin zu Entzündungsprozessen (Inflammation). Ein wichtiges proinflammatorisches Enzym ist die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Nach wie oben beschriebener Stimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  wurde eine deutliche, zeitabhängige Zunahme der Expression von COX-2 gemessen (Abb. 8C). Diese stieg kontinuierlich bereits nach vierstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation an und erreichte eine maximale Konzentration nach 72-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Die densitometrische Analyse der in

dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diesen Befund. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 8:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 72h; deutliche Zunahme der Expression von MMP-9 (A), MMP-13 (B) und COX-2 (C).

### **4.3. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf mit IL-1 $\beta$ stimulierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur**

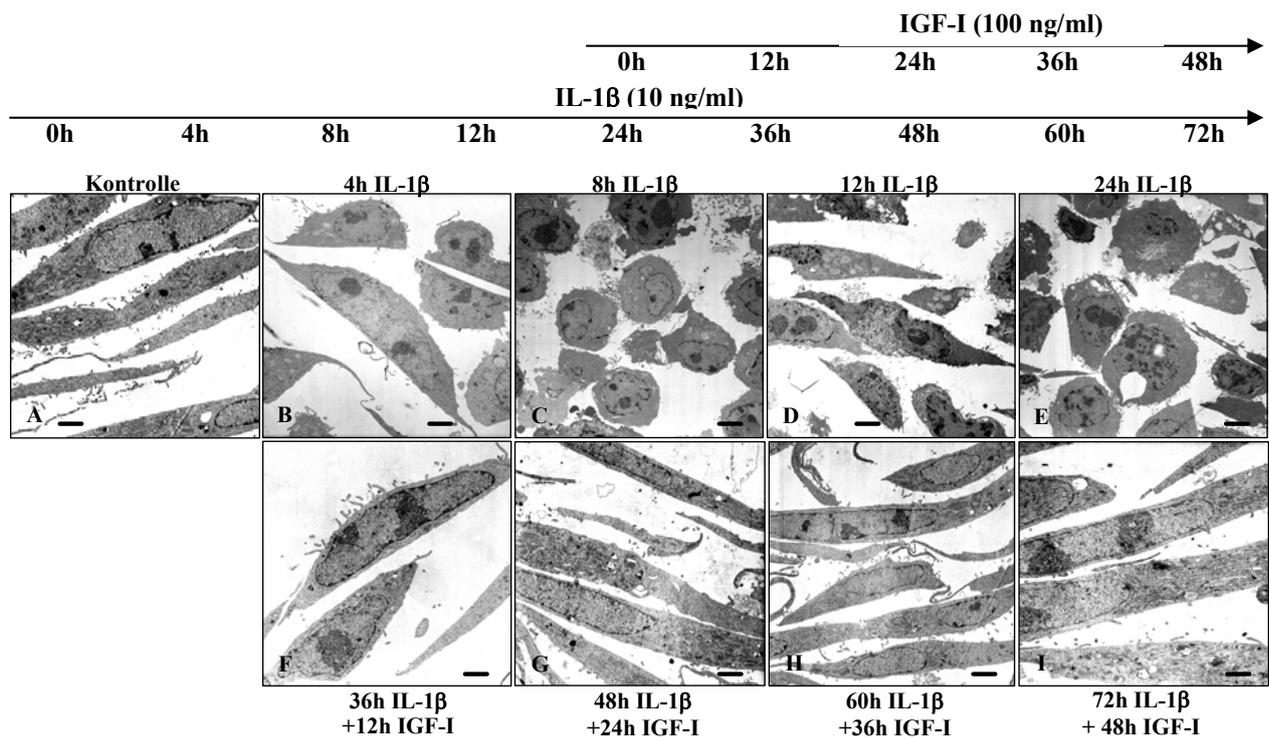
#### 4.3.1. Behandlung mit Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)

##### 4.3.1.1. Elektronenmikroskopie

Um die Auswirkungen von Wachstumsfaktoren auf mit Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) vorstimulierte emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur zu untersuchen, wurde zunächst die Wirkung des Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) analysiert. Dafür wurden emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden (Abb. 9). Mittels Elektronenmikroskopie wurde auf ultrastruktureller Ebene nach Veränderungen gesucht.

Nicht mit IL-1 $\beta$  stimulierte Chondrozyten (Positivkontrolle) zeigten einen typischen chondrogenen Phänotyp (kleine polygonale Zellen mit zahlreichen Mikrovilli, einem euchromatinreichen Zellkern, zahlreiche Zellorganellen und einem feinen perizellulären Saum extrazellulärer Matrixproteine) (Abb. 9A). In mit IL-1 $\beta$  stimulierten Chondrozyten zeigten sich im zeitlichen Verlauf die bereits beschriebenen typischen phänotypischen Veränderungen der Chondrozyten: Die Zellen rundeten sich zunehmend ab, das rER schwoll ebenfalls zunehmend an (Abb. 9B-E). Durch die Ko-Stimulation mit IGF-I änderte sich dieses Bild: Bereits nach zwölfstündiger Behandlung mit IGF-I streckten sich die Chondrozyten wieder, bildeten Mikrovilli aus und der Gehalt an Euchromatin im Zellkern nahm wieder deutlich zu (Abb. 9F). Nach 24-stündiger Ko-Stimulation mit IGF-I waren wieder vermehrt Zellorganellen sichtbar, die deutliche Strukturen aufwiesen (Abb. 9G). Weiterhin waren lang gestreckte Mitochondrien, ein gut ausgeprägtes rER, sowie überwiegend Euchromatin im Zellkern sichtbar. Im perizellulären Raum waren nun wieder deutliche Matrixkomponenten sichtbar (Abb. 9G). Im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation streckten sich die Chondrozyten noch deutlicher und verloren alle morphologischen Anzeichen einer beginnenden Apoptose (Abb. 9H). Nach 48-stündiger Ko-Stimulation zeigte sich ein morphologisch unauffälliges Bild gesunder vitaler Chondrozyten: zahlreiche Mikrovilli auf der Zelloberfläche, viele Zell-Zell-Kontakte, ein Matrixsaum im perizellulären Raum, viele dunkle, längliche Mitochondrien, rER und viele Golgi-Apparate (Abb. 9I)

Die Zellen wurden folgendermaßen behandelt:



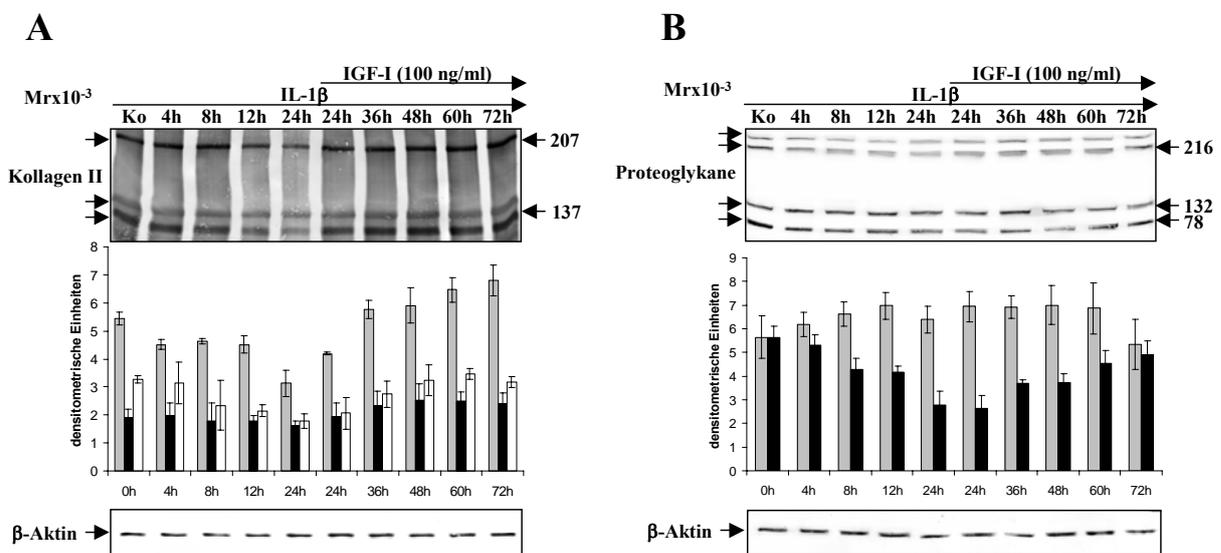
**Abb. 9:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; anschließend Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I (100ng/ml) für weitere 48h. A-I: 5000x; Bars = 1  $\mu$ m

#### 4.3.1.2. Westernblot Analyse

Um die im Elektronenmikroskop gefundenen morphologischen Veränderungen in den mit IL-1 $\beta$  und IGF-I ko-stimulierten Chondrozyten genauer zu untersuchen wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, anti-apoptotische Veränderungen in den Chondrozyten durch die Ko-Stimulation mit IGF-I auch auf Proteinebene zu untersuchen. Wie bereits beschrieben, wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Untersucht wurde der Einfluss der IGF-I-Ko-Stimulation auf die Produktion von Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, knorpelspezifische Proteoglykane), dem Adhäsions- und Signalübertragungsrezeptor  $\beta_1$ -Integrin, dem Adaptorprotein Shc, Erk 1/2 und dem knorpelspezifischen Transkriptionsfaktor Sox9.

Zunächst wurde der Effekt der Ko-Stimulation mit IGF-I auf die knorpeltypischen extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ II und Proteoglykane untersucht. Nach 24-

stündiger IL-1 $\beta$ -Behandlung nahm die Konzentration von Kollagen Typ II (Abb. 10A) und knorpelspezifischer Proteoglykane (Abb. 10B) deutlich ab. Die Ko-Stimulation mit IGF-I führte zu einem gegenteiligen Effekt. Bereits nach 24-stündiger Ko-Stimulation stieg der Gehalt an Kollagen Typ II und knorpelspezifischer Proteoglykane wieder deutlich an (Abb. 10A,B). Dies war besonders deutlich anhand der Kollagen Typ II-Konzentration zu beobachten: Im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation stieg die Konzentration von Kollagen Typ II sogar über den Ausgangswert der unbehandelten Kultur an (Abb. 10A). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte dies. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

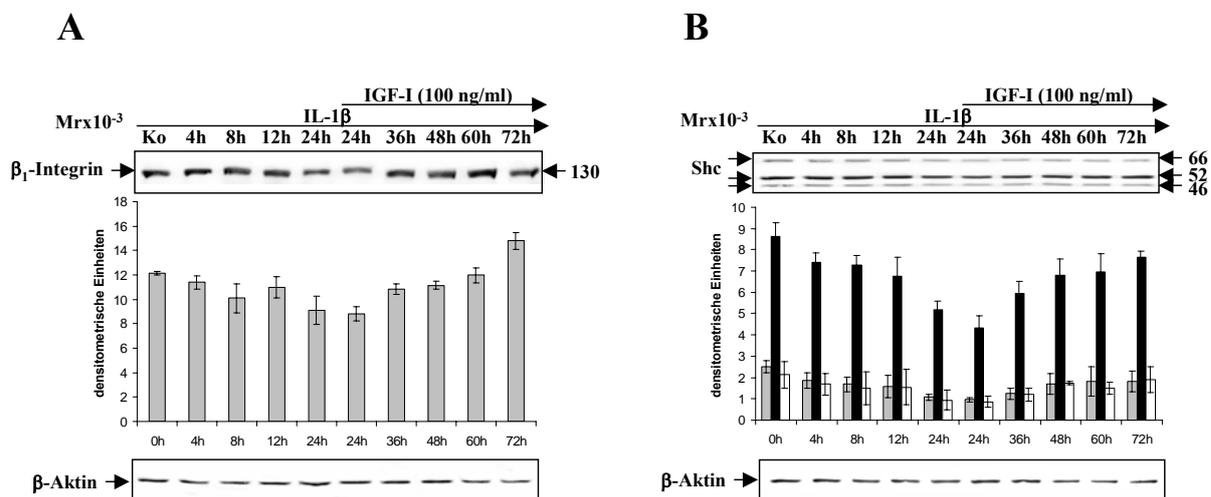


**Abb. 10:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I für weitere 48h; deutlicher Anstieg der Expression von Kollagen Typ II (A) und Proteoglykanen (B) nach Stimulation mit IGF-I; bei Proteoglykanen wurden exemplarisch die unteren zwei Banden gemessen (B).

Die Interaktion zwischen den Proteinen der EZM und den Chondrozyten führt zu einer Aktivierung intrinsischer Signalübertragungswege, welche für das Überleben der Chondrozyten wichtig sind. Die Gruppe der Integrine spielen als eine der wichtigsten Transmembranrezeptoren hierbei eine überaus wichtige Rolle. Wie bereits beschrieben wurden emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine Ko-Stimulation sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu einer deutlichen Abnahme der  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren (Abb.11A). Im Gegenteil hierzu bewirkte die Ko-Stimulation mit IGF-I einen deutlichen Konzentrationsanstieg von  $\beta_1$ -Integrin in den ko-stimulierten Chondrozyten. Die

densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Beobachtungen nicht nur, sondern zeigte deutlich, dass der Konzentrationsanstieg der  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren sogar über dem Ausgangswert lag. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Wie bereits oben beschrieben spielt das Adaptorprotein Shc eine wichtige Rolle als intrazellulärer Signalvermittler und steht am Anfang verschiedener Signalkaskaden unter anderem auch des MAPKinase Signalübertragungsweges. Nach wie oben beschriebener Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  gefolgt von einer IL-1 $\beta$ - und IGF-I-Ko-Stimulation der Chondrozyten kam es zu einer deutlichen Zunahme der Shc-Expression (Abb. 11B). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Expression von Shc bereits nach 24-stündiger Ko-Stimulation wieder deutlich zunahm (Abb. 11B). Die Steigerung war kontinuierlich über den weiteren Verlauf zu beobachten. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

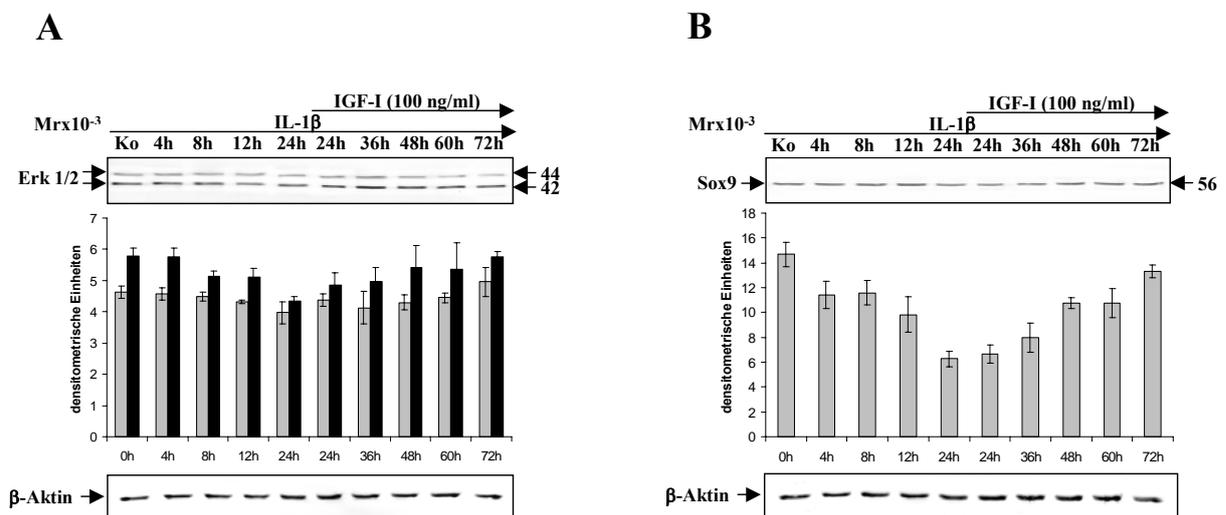


**Abb. 11:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I für weitere 48h; deutlicher Anstieg der Expression von  $\beta_1$ -Integrin (A) und Shc (B) nach Ko-Stimulation mit IGF-I.

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass in Chondrozyten der IGF-I-Rezeptor mit  $\beta_1$ -Integrinen assoziiert und zu einer Aktivierung des MAPKinase Signalübertragungsweges führen kann [74]. Dieser wiederum führt über eine Aktivierung des knorpelspezifischen Transkriptionsfaktors Sox9 zur Proliferation, Differenzierung und dem Überleben der Chondrozyten [79]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Hemmung von Erk 1/2, eine der Schlüsselkinasen des MAPKinase Signalübertragungsweges, in verschiedenen Zelltypen zur Apoptose führt [62]. Emigrierte Chondrozyten wurden, wie oben beschrieben, zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine Ko-Stimulation sowohl mit IL-

1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Untersucht wurden einerseits die Auswirkungen auf den MAPKinase Signalübertragungsweg anhand der Konzentrationsänderungen von aktivierter Erk 1/2 (Abb. 12A), andererseits die Auswirkungen der Ko-Stimulation mit IGF-I auf die Konzentration des knorpelspezifischen Transkriptionsfaktors Sox9 (Abb. 12B).

Die Konzentrationen von aktivierter Erk 1/2 wie auch des Transkriptionsfaktors Sox9 wurden durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung deutlich vermindert. Die Ko-Stimulation mit IGF-I hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung beider Proteine schon nach 24-stündiger Ko-Stimulation. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine kontinuierliche Steigerung im Verlauf der Ko-Stimulation und nach 48 Stunden Ko-Stimulation den deutlichen Konzentrationsanstieg aktivierter Erk 1/2 wie auch von Sox9 im Vergleich zum Anfang. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

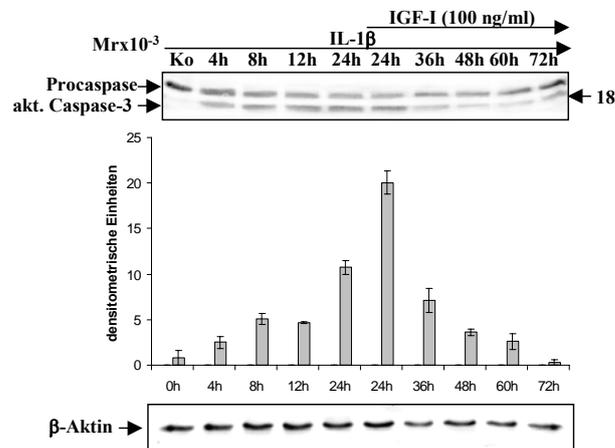


**Abb. 12:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I für weitere 48h; deutlicher Anstieg der Expression von Erk 1/2 (A) und Sox9 (B) nach Ko-Stimulation mit IGF-I.

Da anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutliche anti-apoptotische Effekte durch die Ko-Stimulation mit IGF-I nachweisen werden konnten, wurden mittels Westernblot Analyse Konzentrationsveränderungen wichtiger mit degenerativen und apoptotischen Prozessen assoziierte Proteine wie aktivierte Caspase-3, verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und das proinflammatorische Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) untersucht.

Nach, wie oben beschriebener, 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg aktivierter Caspase-3 (Abb. 13). Die Ko-Stimulation der Chondrozyten mit IGF-I führte jedoch zu einer Herabregulierung der Konzentration aktivierter Caspase-3. Die densitometrische

Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme aktivierter Caspase-3 durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme während der Ko-Stimulation mit IGF-I. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

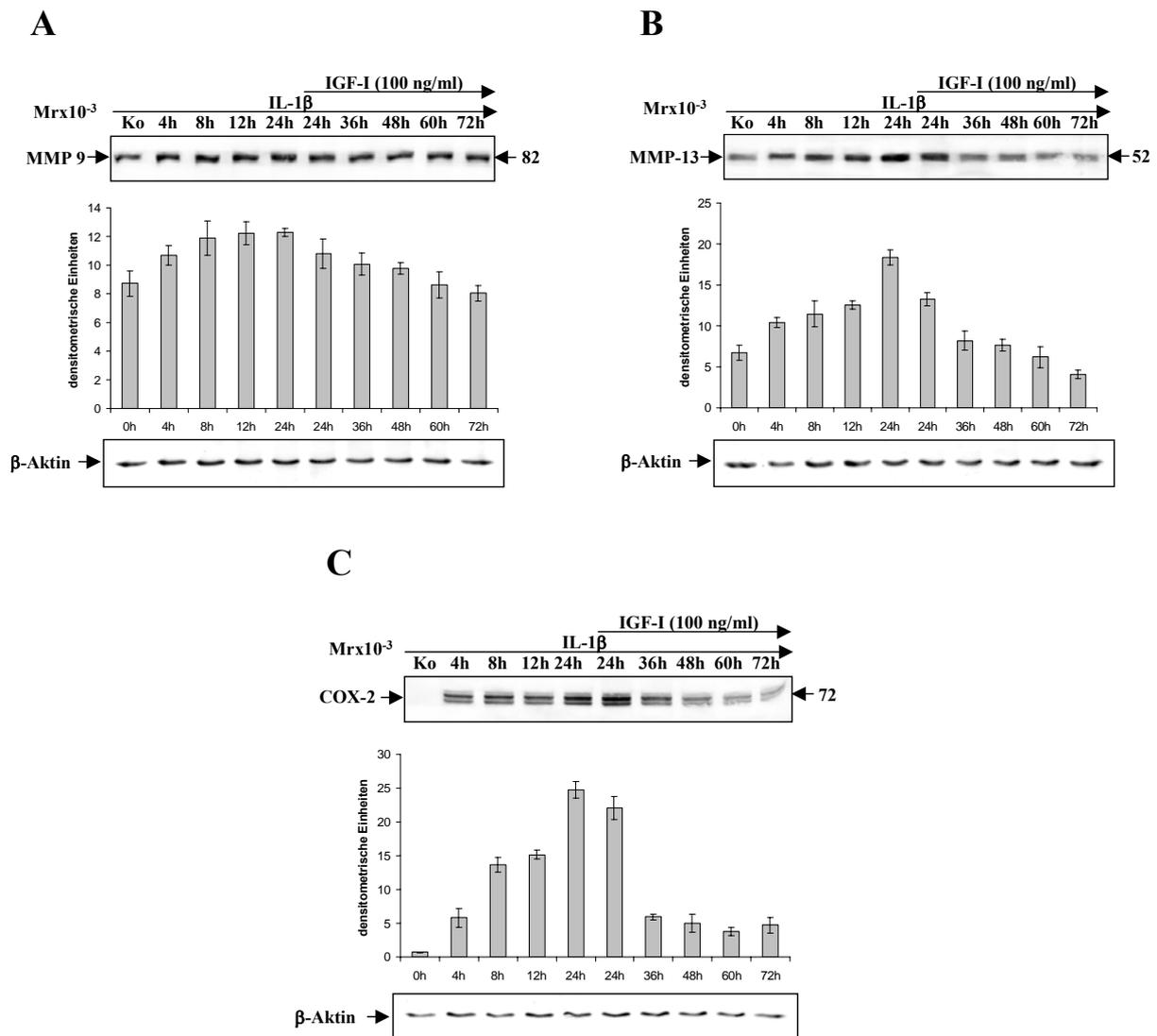


**Abb. 13:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I für weitere 48h; deutliche Abnahme der Expression von Caspase-3 nach Ko-Stimulation mit IGF-I.

Der Abbau extrazellulärer Matrixproteine durch MMPs führt zu einem Verlust der Zell-Matrix-Interaktion und zur Einleitung apoptotischer Signalübertragungswege. Weiterhin wurde nun untersucht, inwieweit IGF-I in der Lage ist, die Aktivierung der MMPs zu unterbinden. Nach, wie oben beschriebener, 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg von MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-13 (Kollagenase 3) (Abb. 14A,B). Durch die Ko-Stimulation der Chondrozyten mit IGF-I nahm die Konzentration beider MMPs schon nach 24-stündiger Ko-Stimulation wieder deutlich ab. Die Konzentrationsabnahme war dabei deutlicher bei MMP-13 (Abb. 14B) als bei MMP-9 (Abb. 14A) zu beobachten. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme der MMP-Konzentrationen durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme während der Ko-Stimulation mit IGF-I. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Ko-Stimulation mit IGF-I auf die Konzentration des proinflammatorischen Enzyms COX-2 in den mit IL-1 $\beta$  vorstimulierten Chondrozyten hat. Zu diesem Zweck wurden emigrierte Chondrozyten wie oben beschrieben behandelt. Nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg der COX-2-Konzentration in den Chondrozyten (Abb. 14C). Die Ko-Stimulation mit IGF-I führte bereits

nach 24 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der COX-2-Expression. Nach 36-stündiger Ko-Stimulation mit IGF-I sank die Konzentration der COX-2 sogar noch deutlicher ab. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme der COX-2-Konzentrationen durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme durch die Ko-Stimulation mit IGF-I bereits nach 24 Stunden Ko-Stimulation. Weiterhin auffällig war, dass nach 36 Stunden Ko-Stimulation nur noch etwa ein Fünftel der COX-2-Konzentration vorhanden war (Abb. 14C). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 14:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I für weitere 48h; deutliche Abnahme der Expression von MMP-9 (A), -13 (B) und COX-2 (C) nach Ko-Stimulation mit IGF-I.

### 4.3.2. Behandlung mit Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

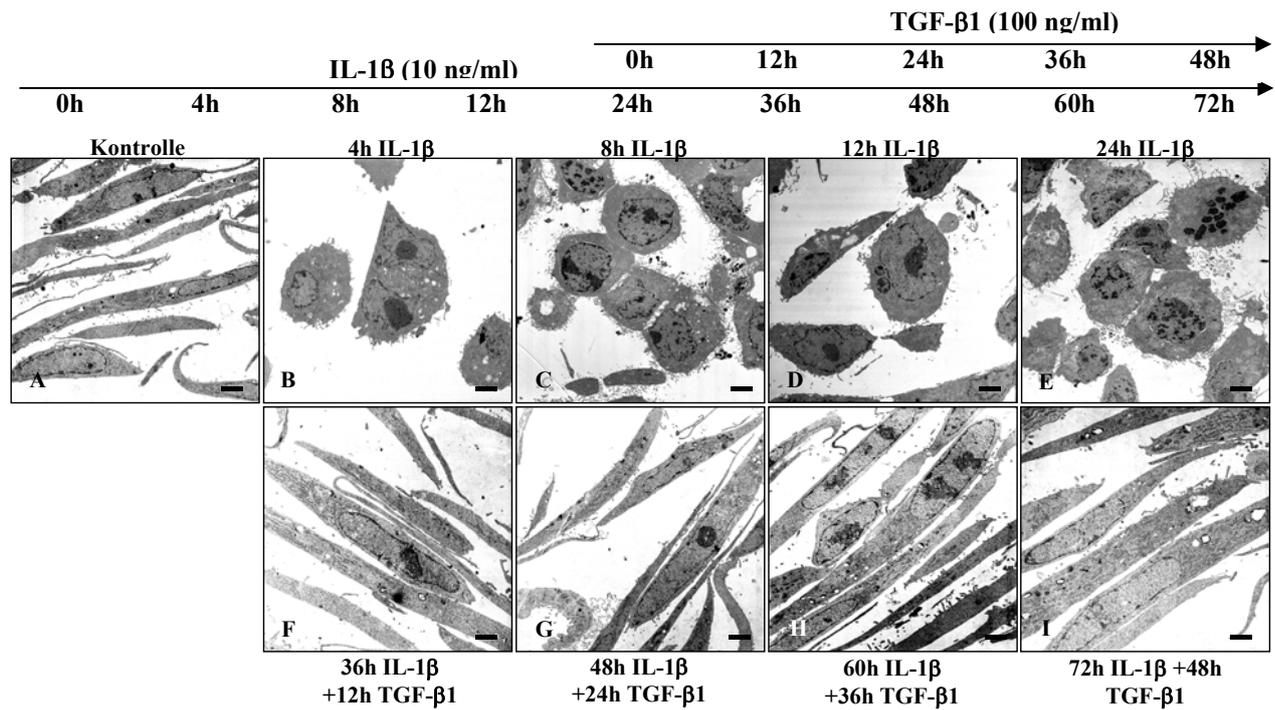
#### 4.3.2.1. Elektronenmikroskopie

Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) stellt einen der wichtigsten anabolen Wachstumsfaktoren verschiedenster Gewebe, wie auch des Knorpels, dar. Er reguliert wichtige Mechanismen wie Zellwachstum, Differenzierung, Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile und beeinflusst die Apoptose [118]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf mit IL-1 $\beta$  stimulierte emigrierte Chondrozyten untersucht werden. Zunächst wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorbehandelt um eine Dedifferenzierung zu initiieren. Danach erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit TGF- $\beta$ 1 (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden (Abb. 15). Die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 wurde auf ultrastruktureller Ebene mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

In der Positivkontrolle zeigten nicht mit IL-1 $\beta$  stimulierte Chondrozyten einen typischen chondrogenen Phänotyp mit zahlreichen, organisierten und gut ausgebildeten Zellorganellen (Abb. 15A). Weiterhin war ein euchromatinreicher Zellkern, zahlreiche Mikrovilli auf der Zelloberfläche und ein feiner perizellulärer Saum extrazellulärer Matrixproteine sichtbar. Im Gegensatz dazu waren in mit IL-1 $\beta$  stimulierten Chondrozyten deutliche Veränderungen der Zellen sichtbar. Im zeitlichen Verlauf der IL-1 $\beta$ -Stimulation traten die bereits beschriebenen typischen phänotypischen Veränderungen an den Chondrozyten auf. Bereits nach vierstündiger Inkubationszeit waren deutliche Apoptoseanzeichen sichtbar, unter anderem abgerundete Zellen, geschwollene Mitochondrien und aufgeblähtes rER. Im weiteren Verlauf der IL-1 $\beta$ -Stimulation zeigte sich zusätzlich eine Verdichtung des Chromatins (Heterochromatin), multiple Vakuolen, ein Verlust an Mikrovilli (Abb. 15B-E).

Die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einer raschen Regeneration der Chondrozyten bereits zwölf Stunden nach Beginn der Ko-Stimulation (Abb. 15F). Die Zellen streckten sich wieder vermehrt, bildeten neue Mikrovilli und Zytoplasmafortsätze aus und verloren alle morphologischen Anzeichen einer beginnenden Apoptose. Im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation nahm der Gehalt an Euchromatin deutlich zu, die Vakuolen verschwanden und die Zellorganellen wirkten wieder zunehmend strukturiert (Abb. 15G-H). Nach 48-stündiger Ko-Stimulation zeigte sich ein morphologisch unauffälliges Bild gesunder vitaler Chondrozyten: zahlreiche Mikrovilli auf der Zelloberfläche, viele Zell-Zell-Kontakte, ein Matrixsaum im perizellulären Raum, viele dunkle, längliche Mitochondrien, rER und viele Golgi-Apparate (Abb. 15I).

Die Zellen wurden folgendermaßen behandelt:



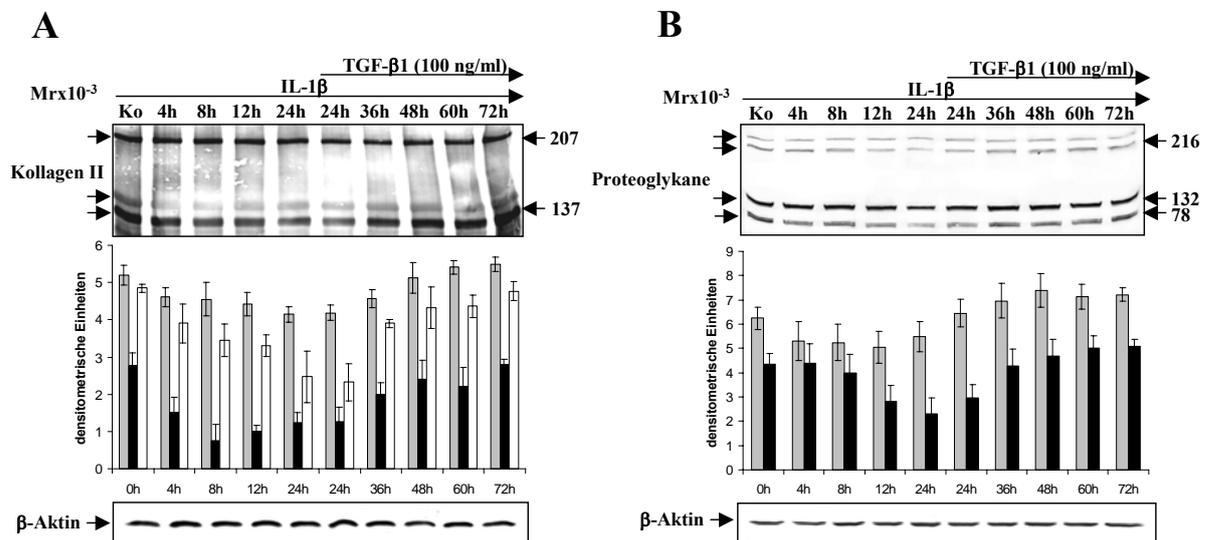
**Abb. 15:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL- $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL- $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 (100ng/ml) für weitere 48h. A-I: 5000x; Bars = 1  $\mu$ m

#### 4.3.2.2. Westernblot Analyse

Um die mittels Elektronenmikroskopie auf morphologischer Ebene gewonnenen Erkenntnisse über die Ko-Stimulation von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 und ihre Auswirkungen auf Chondrozyten auch auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, wurden zusätzlich Westernblot Analysen durchgeführt. Emigrierte Chondrozyten wurden dabei in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit TGF- $\beta$ 1 (100 ng/ml) für weitere 48 Stunden. Untersucht wurde der Einfluss der TGF- $\beta$ 1-Ko-Stimulation auf die Produktion von Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, knorpelspezifische Proteoglykane), dem Adhäsions- und Signalübertragungsrezeptor  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin, dem Adaptorprotein Shc, der extracelluar regulated kinase 1/2 (Erk 1/2) und dem knorpelspezifischen Transkriptionsfaktor Sox9.

Die Behandlung mit IL-1 $\beta$  führte zu einem deutlichen Konzentrationsabfall sowohl von Kollagen Typ II (Abb. 16A) als auch der Proteoglykane (Abb. 16A), der am deutlichsten nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation ausgeprägt war. Die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 hingegen führte zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg. Dieser war sowohl für Kollagen Typ II (Abb. 16A) als auch für Proteoglykane (Abb. 16B) bereits nach 24-stündiger Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1

signifikant. Die Kollagen Typ II-Konzentration stieg im weiteren Verlauf weiter an (Abb. 16A), wohingegen die Konzentration der Proteoglykane zum Ende wieder leicht abfiel (Abb. 16B). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Befunde. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

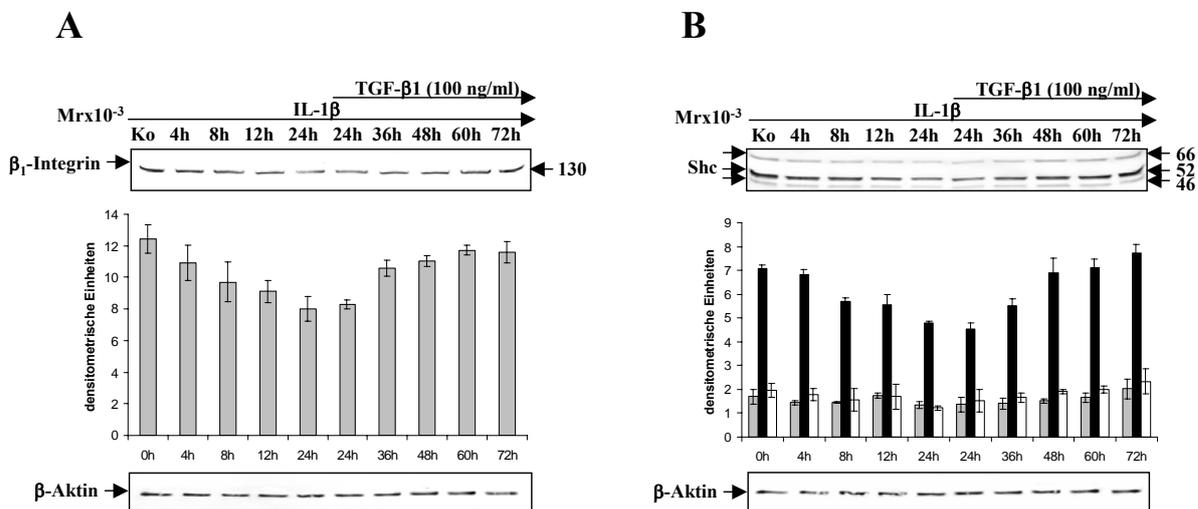


**Abb. 16:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL- $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48h; deutlicher Anstieg der Expression von Kollagen Typ II (A) und Proteoglykanen (B) nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1; bei Proteoglykanen wurden exemplarisch die unteren zwei Banden gemessen (B).

Wie bereits oben beschrieben spielt die Gruppe der Integrine als Transmembranrezeptoren eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen. Emigrierte Chondrozyten wurden in Monolayer-Kultur 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) behandelt und daraufhin mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 ko-stimuliert. Während der Behandlung mit IL-1 $\beta$  kam es zu einer deutlichen Abnahme der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin-Konzentration in den Chondrozyten (Abb. 17A). Nach Beginn der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 stieg die Konzentration von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin bereits nach 24-stündiger Ko-Stimulation wieder deutlich an. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte dies. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Als intrazellulärer Signalvermittler steht das Adaptorprotein Shc am Anfang verschiedener Signalkaskaden. Um den Effekt der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von Shc zu untersuchen, wurden die Chondrozyten zunächst mit IL-1 $\beta$  behandelt und danach erfolgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1. Nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  kam es zu einer deutlichen Abnahme der Shc-Konzentration in den Chondrozyten (Abb. 17B). Nach Ko-Stimulation mit

TGF- $\beta$ 1 stieg die Shc-Konzentration bereits nach 36 Stunden deutlich an. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte dies und zeigte, dass die Shc-Konzentration am Ende des Versuchs den Ausgangswert erreichte (Abb. 17B). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

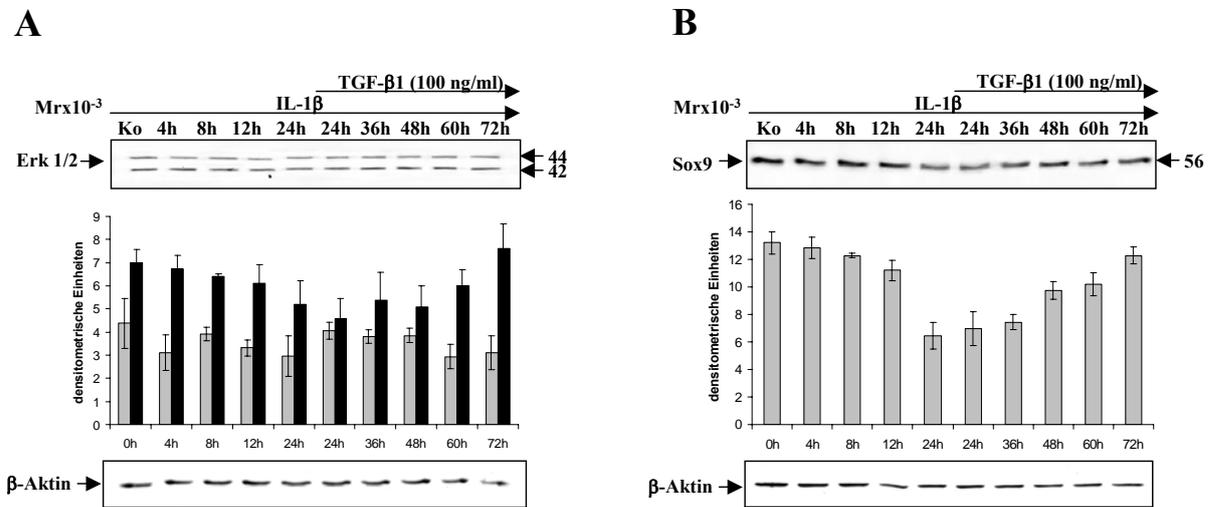


**Abb. 17:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL- $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48h; deutlicher Anstieg der Expression von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin (A) und Shc (B) nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1.

Als Mitglied des MAPKinase Signalübertragungsweges ist die Phosphorylierung der extracellular regulated kinase 1 und 2 (Erk 1/2) ein wichtiger Marker für dessen Aktivierung. Die Chondrozyten wurden mit IL-1 $\beta$  vorbehandelt und danach erfolgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1. Nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  kam es zu einer deutlichen Abnahme aktivierter Erk 1/2 in den Chondrozyten (Abb. 18A). Im Verlauf der Ko-Stimulation stieg die Konzentration aktivierter Erk 1/2 in den Chondrozyten wieder deutlich an (Abb. 18A). In der densitometrischen Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots war ein deutlicher Anstieg aktivierter Erk 1/2 nach Beginn der Ko-Stimulation sichtbar. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Der chondrogene Transkriptionsfaktor Sox9 wird durch den MAPKinase Signalübertragungsweg aktiviert und steuert in den Chondrozyten die Expression extrazellulärer Matrixproteine wie zum Beispiel die Kollagen Typ II-Genexpression. Nach IL-1 $\beta$ -Stimulation für 24 Stunden erfolgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1. Im Verlauf der IL-1 $\beta$  Stimulation nahm die Konzentration von Sox9 in den Chondrozyten bereits nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  deutlich ab (Abb. 18B). Nach 24 Stunden IL-1 $\beta$ -Stimulation war die Sox9-Konzentration halbiert. Die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bewirkte einen neuerlichen Anstieg der Sox9-

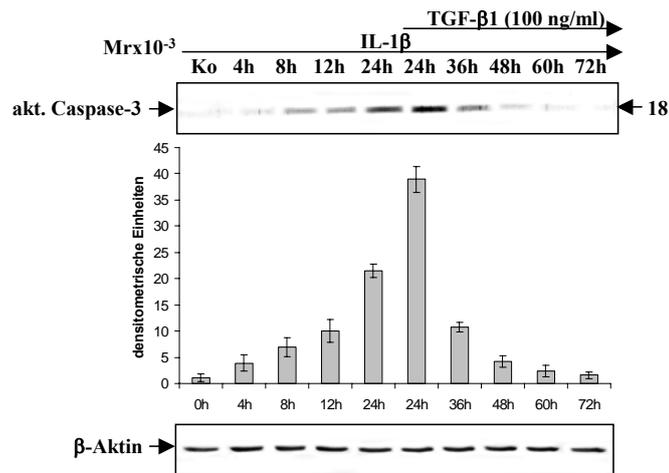
Konzentration. Nach 72 Stunden Ko-Stimulation erreichte sie fast die Ausgangskonzentration. Die densitometrische Analyse bestätigte diesen Befund. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 18:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48h; deutliche Zunahme der Expression von Erk 1/2 (A) und Sox9 (B) nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1.

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung waren nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  degenerative und apoptotische Veränderungen bereits nach wenigen Stunden der Inkubation sichtbar. Die weitere Behandlung der Chondrozyten resultierte in Apoptose und Zelllyse. Nun sollte auch auf molekularbiologischer Ebene der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf degenerative und Apoptose-assoziierte Proteine wie aktivierte Caspase-3, verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und das proinflammatorische Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) untersucht werden. Hierfür wurden Westernblot Analysen durchgeführt.

Einen der wichtigsten Apoptosemarker stellt aktivierte Caspase-3 dar. Nach wie oben beschriebener Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  kam es bereits nach vierstündiger Behandlung zu einem Anstieg aktivierter Caspase-3, der nach 24 Stunden am deutlichsten war (Abb. 19). Die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 führte bereits nach 24 Stunden zu einem deutlichen Konzentrationsabfall aktivierter Caspase-3 und nach 72-stündiger Ko-Stimulation war kaum noch aktivierte Caspase-3 nachweisbar. In der densitometrischen Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots war ein deutlicher Anstieg aktivierter Caspase-3 nach IL-1 $\beta$ -Stimulation und ein deutlicher Abfall aktivierter Caspase-3-Konzentration während der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 sichtbar. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

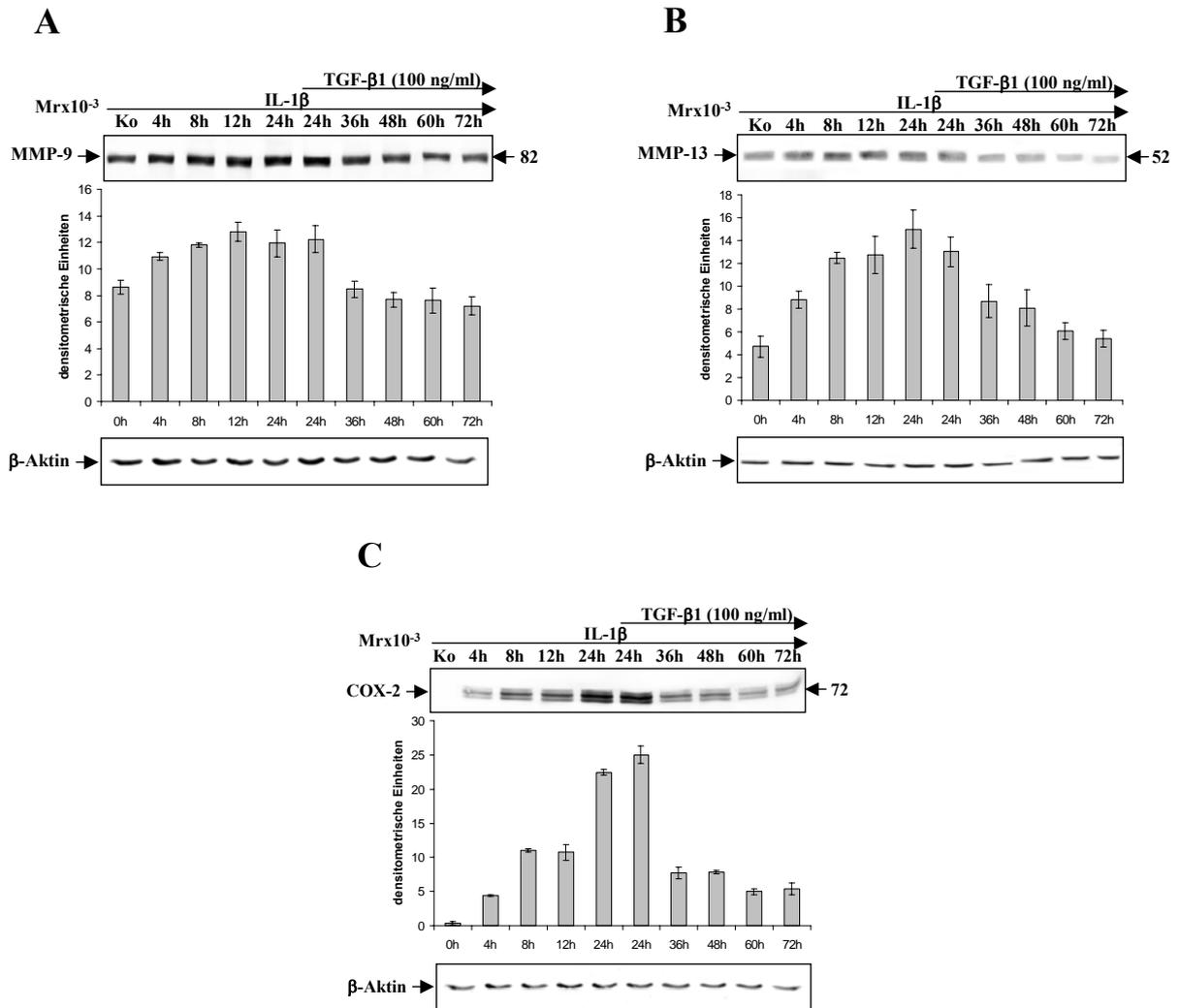


**Fig.19:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48h; signifikante Abnahme der Expression von Caspase-3 nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1.

Wie oben beschrieben führt der Abbau extrazellulärer Matrixproteine durch MMPs zu einem Verlust der Zell-Matrix-Interaktion und zur Einleitung apoptotischer Signalübertragungswege. Zusätzlich wurde nun untersucht, ob TGF- $\beta$ 1 die Aktivierung der MMPs hemmen kann. Die Chondrozyten wurden hierfür 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  behandelt. Danach erfolgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1. Nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg von MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-13 (Kollagenase 3) (Abb. 20A,B). Hierbei war der Konzentrationsanstieg von MMP-13 deutlich stärker (Abb. 20B) als der von MMP-9 (Abb. 20A). Durch die Ko-Stimulation der Chondrozyten mit TGF- $\beta$ 1 nahm die Konzentration beider MMPs wieder deutlich ab. Die Konzentrationsabnahme war dabei wiederum deutlicher bei MMP-13 (Abb. 20B) als bei MMP-9 (Abb. 20A) zu beobachten. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Befunde und zeigte eine deutliche Zunahme der MMP-Konzentrationen durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme während der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

Weiterhin wurde der Einfluss der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 auf die Konzentration des proinflammatorischen Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den mit IL-1 $\beta$ -behandelten Chondrozyten untersucht. Die Chondrozyten wurden hierfür 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  behandelt und im Anschluss mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 ko-stimuliert. Bereits nach vierstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg der COX-2-Konzentration in den Chondrozyten (Abb. 20C). Im Gegensatz dazu war bereits nach 36-stündiger Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine signifikante

Konzentrationsabnahme zu beobachten. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme der COX-2-Konzentration durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie bereits nach 36 Stunden eine signifikante Abnahme durch die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1. Weiterhin auffällig war, dass nach 36 Stunden Ko-Stimulation nur noch etwa ein Drittel der COX-2-Konzentration vorhanden war. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Fig.20:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 24h und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 für weitere 48h; signifikante Abnahme der Expression von MMP-9 (A), -13 (B) und COX-2 (C) nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1.

### 4.3.3. Kombinierte Behandlung mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1

#### 4.3.3.1. Elektronenmikroskopie

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, wiesen die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 im Einzelnen starke anabole Wirkungen auf mit IL-1 $\beta$  vorstimulierte emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur auf. Auf ultrastruktureller Ebene zeigte sich dies vor allem in der raschen Regeneration der Chondrozyten nach bereits wenigen Stunden Ko-Stimulation mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1. Im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation verloren die Chondrozyten nach und nach sämtliche Zeichen apoptotischer oder degenerativer Veränderungen, sodass sich nach 48-stündiger Ko-Stimulation mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 ein morphologisch unauffälliges Bild gesunder, vitaler Chondrozyten mit zahlreichen Mikrovilli auf der Zelloberfläche, vielen Zell-Zell-Kontakten, einem Matrixsaum im perizellulären Raum, vielen dunklen, länglichen Mitochondrien, rER und vielen Golgi-Apparaten ergab.

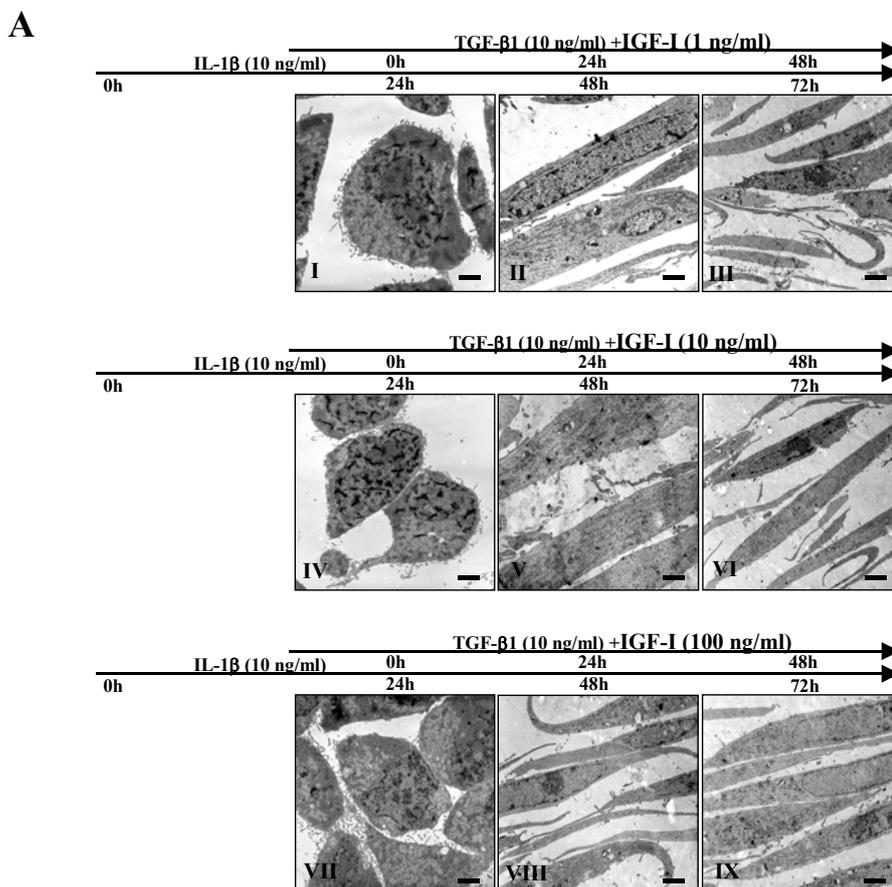
Aufgrund dieser jeweils stark anabolen Effekte von IGF-I und von TGF- $\beta$ 1 im Einzelnen wurden die Untersuchungen erweitert. Potentiell synergistische Effekte beider Wachstumsfaktoren in Kombination miteinander und in unterschiedlichen Konzentrationen sollten analysiert werden. Hierzu wurden emigrierte Chondrozyten zunächst mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  für 24 Stunden vorstimuliert. Im Anschluss erfolgte die Ko-Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , sowie mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen. In einem ersten Ansatz wurde TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 10 ng/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml) kombiniert (Abb. 21A). Ein weiterer Ansatz beinhaltete die Kombination von IGF-I (konstant 10 ng/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml) (Abb. 21B). Die Proben wurden nach 0, 24 und 48 Stunden Ko-Stimulation entnommen und mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

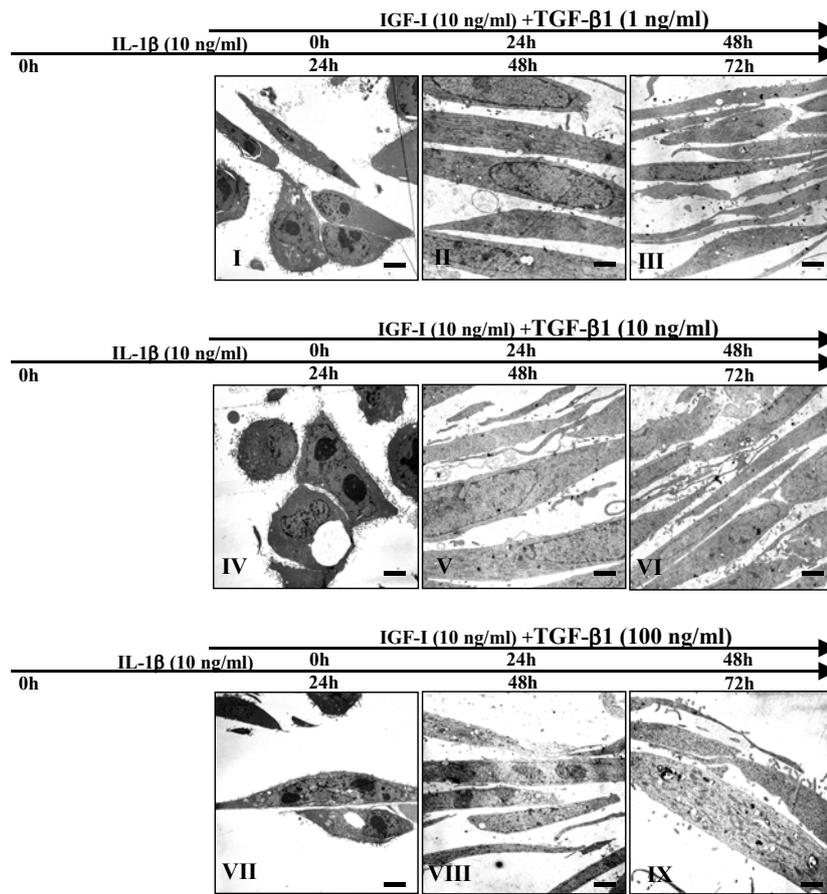
Nach der Vorstimulation der emigrierten Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) über 24 Stunden ergab sich das Bild der bereits beschriebenen phänotypischen Veränderungen an den Chondrozyten: Deutliche Apoptoseanzeichen mit unter anderem abgerundeten Zellen, geschwollenen Mitochondrien und aufgeblähtem rER. Zusätzlich kam es zu einer Verdichtung des Chromatins (Heterochromatin); weiterhin waren multiple Vakuolen sowie ein Verlust an Mikrovilli sichtbar (Abb. 21A,B I,IV,VII).

Die sich direkt anschließende Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren führte zu einer umgehenden Änderung der phänotypisch dedifferenzierten Chondrozyten. Bereits nach 24-stündiger Behandlung mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 waren die Zellen deutlich erholt und die Chondrozyten streckten sich wieder. Auf der Zelloberfläche waren

Mikrovilli sichtbar und die Zellorganellen wirkten zunehmend strukturiert. Der Gehalt an Euchromatin im Zellkern nahm wieder deutlich zu. Im perizellulären Raum waren nun wieder deutliche Matrixkomponenten sichtbar (Abb. 21A,B II,V,VIII). Im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren in Kombination verloren die Chondrozyten nach und nach die Zeichen der Degeneration und der beginnenden Apoptose. Nach 48 Stunden der Ko-Stimulation mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 war das Zellbild weiter verdichtet mit gestreckten Chondrozyten, welche nun alle morphologischen Anzeichen einer beginnenden Apoptose verloren hatten. Es zeigte sich ein unauffälliges Bild gesunder vitaler Chondrozyten. Auf der Zelloberfläche waren zahlreiche Mikrovilli sichtbar. Außerdem bildeten die Zellen viele Zell-Zell-Kontakte aus. Im perizellulären Raum war ein Matrixsaum erkennbar und im Zytoplasma viele dunkle, längliche Mitochondrien, rER und viele Golgi-Apparate (Abb. 21A,B III,VI,IX). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 starke anabole Wirkung auf die mit IL-1 $\beta$  behandelten Chondrozyten hatte. Es konnten auf ultrastruktureller Ebene jedoch keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in ihrer Kombination festgestellt werden.

Die Zellen wurden folgendermaßen behandelt:



**B**

**Abb. 21:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. **A:** Konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml), variiierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** Konstante Konzentration von IGF-I (10 ng/ml), variiierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml). A,B I-IX: 5000x; Bars = 1  $\mu$ m

#### 4.3.3.2. Westernblot Analyse

In den vorangegangenen Untersuchungen mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 im Einzelnen konnten deutliche anabole Effekte auf die Expression knorpeltypischer Proteine in mit IL-1 $\beta$  vorstimulierten emigrierten Chondrozyten aufgezeigt werden. Im Einzelnen bewirkten IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 hierbei einen Konzentrationsanstieg der knorpeltypischen Matrixproteine (Kollagen Typ II Proteoglykane), sowie des Adhäsions- und Signalübertragungsrezeptors  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin, des Adaptorproteins Shc, der extracelluar regulated kinase 1/2 (Erk 1/2) und des knorpelspezifischen Transkriptionsfaktors Sox9. Wie außerdem gezeigt werden konnte, waren sowohl IGF-I als auch TGF- $\beta$ 1 in der Lage, die Synthese wichtiger mit degenerativen und apoptotischen Prozessen

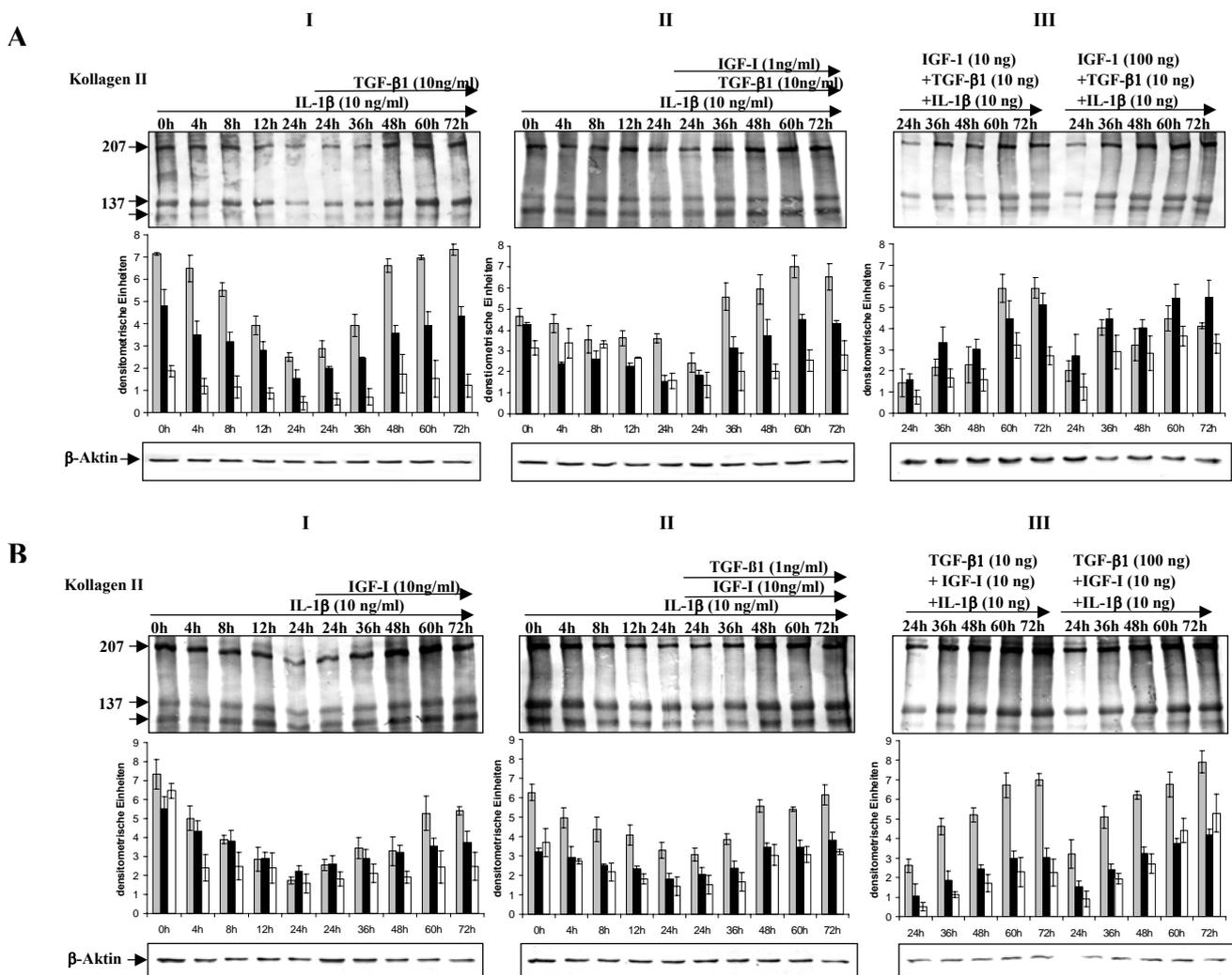
assoziierte Proteine, wie aktivierte Caspase-3, verschiedene MMPs und das proinflammatorische Enzym Cyclooxygenase 2 (COX-2) zu hemmen.

Aufgrund der starken Wirkungen von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 im Einzelnen sollte nun in einem weiteren Ansatz der potentielle Synergismus von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Kombination auf mit IL-1 $\beta$  vorstimulierte emigrierte Chondrozyten analysiert werden. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben hierzu eine rasche Abnahme der durch die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  induzierten degenerativen Veränderungen der Chondrozyten nach Ko-Stimulation durch die beiden Wachstumsfaktoren in Kombination. Wie dargestellt, konnten auf ultrastruktureller Ebene allerdings keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und ihrer Kombinationen festgestellt werden (siehe oben). Um die morphologischen Veränderungen in den mit IL-1 $\beta$  sowie mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 ko-stimulierten Chondrozyten genauer zu untersuchen, wurden daher zusätzlich Westernblot Analysen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, auf Proteinebene zu untersuchen, ob die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 stärkere (synergistische) Effekte auf die IL-1 $\beta$ -stimulierten apoptotischen Veränderungen in den Chondrozyten darstellt und welche Konzentration hierfür am effektivsten ist.

Wie bereits beschrieben wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 (beide in unterschiedlichen Konzentrationen) für weitere 48 Stunden. Untersucht wurde der Einfluss der IGF-I-TGF- $\beta$ 1-Ko-Stimulation zunächst auf die Produktion der Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, knorpelspezifische Proteoglykane), dem Adhäsions- und Signalübertragungsrezeptor  $\beta$ 1-Integrin, dem Adaptorprotein Shc, der extracellulär regulierten Kinase (Erk) und dem knorpelspezifischen Transkriptionsfaktor Sox9. Der Effekt der Kombinationsbehandlung mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 wurde zunächst für die Expression von Kollagen Typ II untersucht, wobei in einem ersten Ansatz TGF- $\beta$ 1 (konstant 10 ng/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml) kombiniert wurde (Abb. 22A). In einer weiteren Untersuchung wurde IGF-I (konstant 10 ng/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml) kombiniert (Abb. 22B).

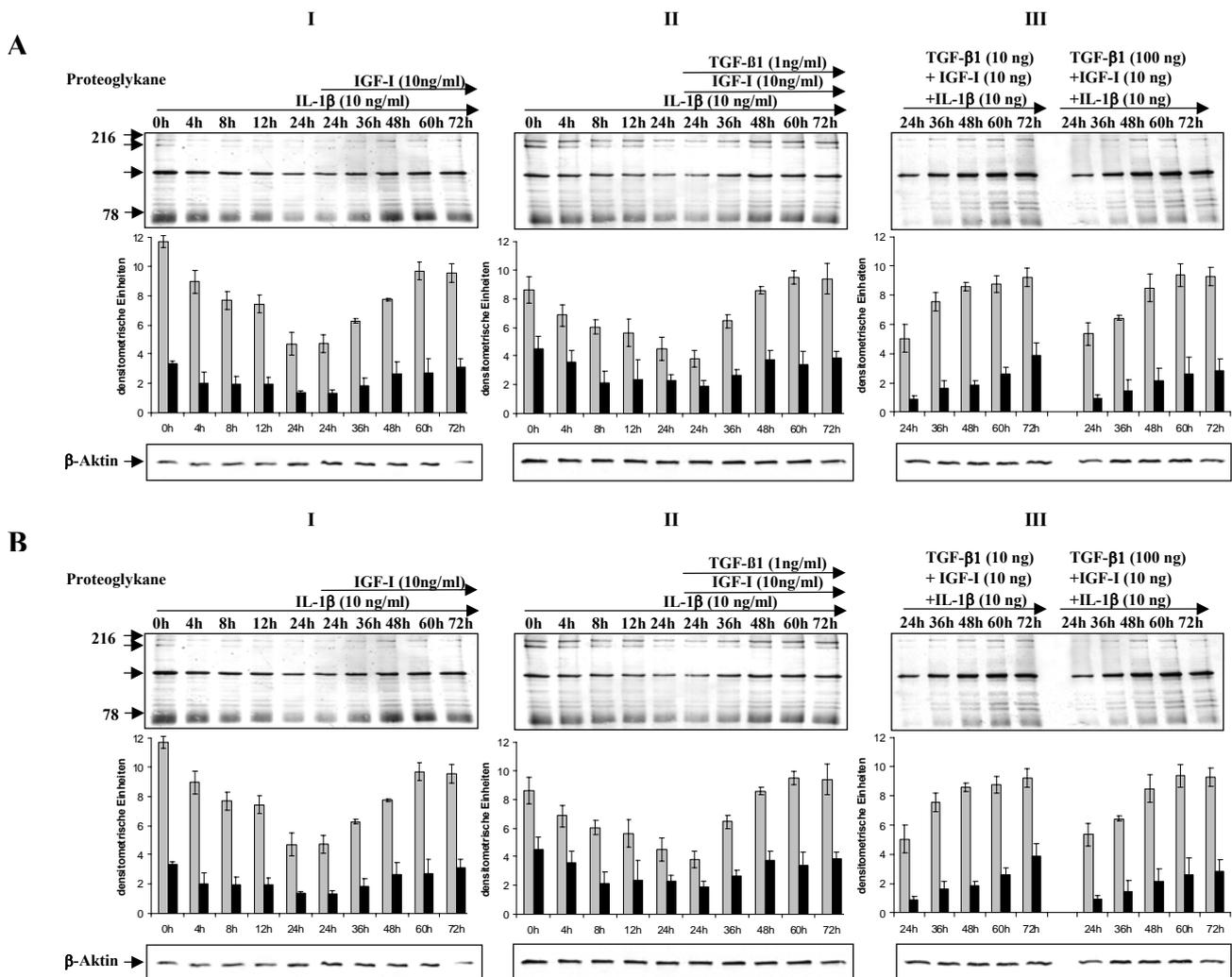
Die Vor-Behandlung mit IL-1 $\beta$  führte zu einem Konzentrationsabfall von Kollagen Typ II, der nach 24 Stunden deutlich ausgeprägt war (Abb. 22A,B I-III). Hingegen führte sowohl die alleinige Ko-Stimulation entweder mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 (Abb. 22A,B I), wie auch die Ko-Stimulation mit einer Kombination beider Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen

Konzentrationen (Abb. 22A,B II,III) zu einem neuerlichen, deutlichen Konzentrationsanstieg von Kollagen Typ II. Dieser war bereits nach zwölfstündiger Ko-Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren in allen Kombinationen signifikant. Die Kollagen Typ II-Konzentration stieg im weiteren Verlauf der Ko-Stimulation weiter an und erreichte wieder den Wert der Ausgangskonzentration (Abb. 22A,B I,II). Dabei führte die Kombinationsbehandlung mit erhöhten Dosen beider Wachstumsfaktoren (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 10 ng/ml IGF-I oder 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 100 ng/ml IGF-I oder 10 ng/ml IGF-I und 100 ng/ml TGF- $\beta$ 1) zu einem noch deutlicheren Anstieg der Kollagen Typ II-Konzentration, welche die Ausgangswerte noch überschritt (Abb. 22A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Befunde. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 22:** Westernblot Analyse der in Monolayer nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme von Kollagen Typ II durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konz. von TGF- $\beta$ 1; variierende Konz. von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konz. von IGF-I, variierende Konz. von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

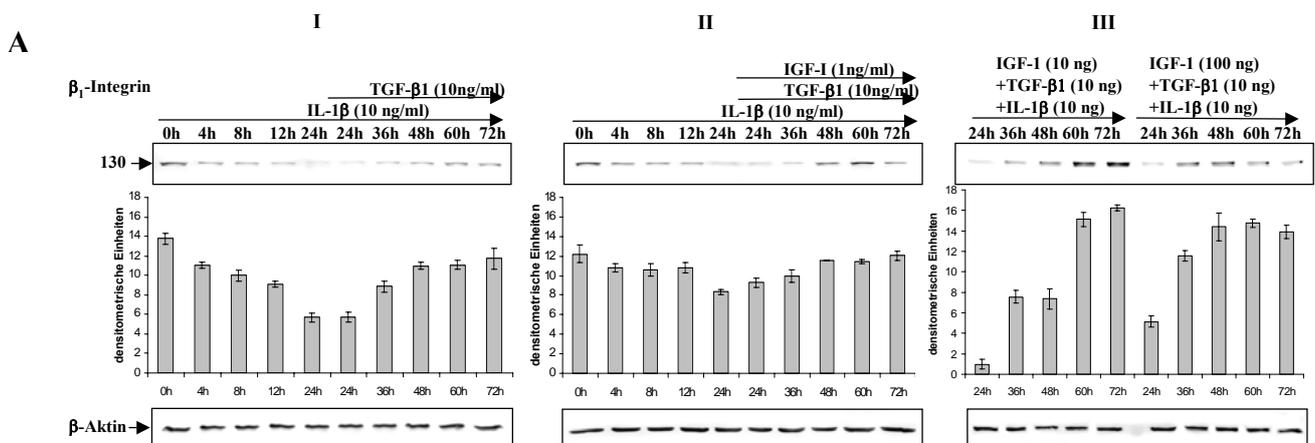
Die Vorstimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  führte auch in der Expression der Proteoglykane zu einer deutlichen Abnahme (Abb. 23A,B I-III). Nach Beginn der Ko-Stimulation entweder mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 23A,B I) oder mit einer Kombination beider Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 23B II-III) stieg die Konzentration der Proteoglykane bereits nach 24 Stunden wieder deutlich an. Ein signifikanter Konzentrationsanstieg wurde durch die Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und IGF-I oder 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 100 ng/ml IGF-I oder 10 ng/ml IGF-I und 100 ng/ml TGF- $\beta$ 1) beobachtet (Abb. 23A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diesen Befund und zeigte, dass die Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren nach 48 Stunden Werte erreichte, welche die Ausgangskonzentration deutlich überschritten. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

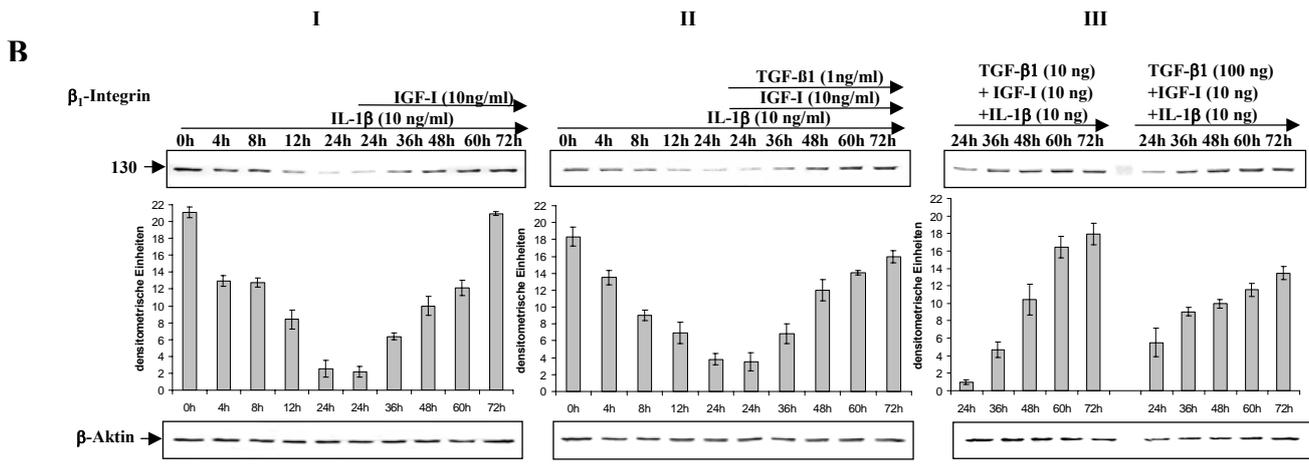


**Abb. 23:** Westernblot Analyse der in Monolayer nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme der Proteoglykane durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konz. von TGF- $\beta$ 1; variierende Konz. von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konz. von IGF-I, variierende Konz. von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml). Bei Proteoglykanen wurden exemplarisch die unteren zwei Banden gemessen.

Integrine als wichtigste Transmembranrezeptoren und Adhäsionsproteine der Chondrozyten spielen eine wesentliche Rolle in der Interaktion der Zellen miteinander und mit der sie umgebenden EZM, wodurch es zur Aktivierung entscheidender Signaltransduktionswege kommt, die wichtig für die Differenzierung und das Überleben der Chondrozyten sind. Wie oben bereits beschrieben wurden emigrierte Chondrozyten zunächst 24 Stunden in Monolayer-Kultur mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen ko-stimuliert.

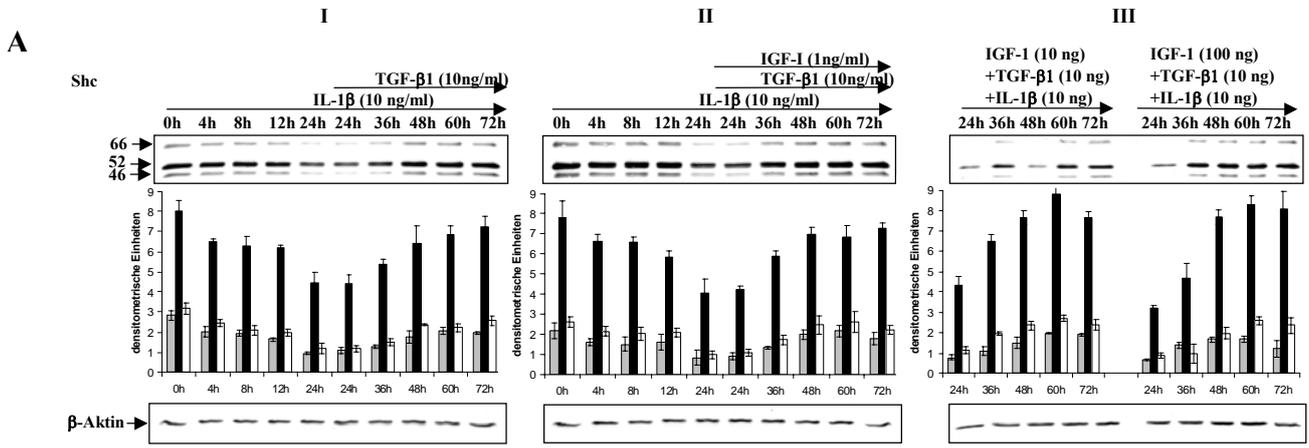
Die Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu einer deutlichen Abnahme der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrinrezeptoren nach 24 Stunden (Abb. 24A,B I-III). Im Gegensatz hierzu führte die Ko-Stimulation mit entweder IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 24A,B I) oder mit einer Kombination beider Wachstumsfaktoren in verschiedenen Konzentrationen (Abb. 24A,B II-III) bereits nach zwölf Stunden zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrinen. Die Kombinationsbehandlung mit erhöhten Dosen beider Wachstumsfaktoren (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 10ng/ml IGF-I oder 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 100 ng/ml IGF-I oder 10 ng/ml IGF-I und 100 ng/ml TGF- $\beta$ 1) führte zu einem noch deutlicheren Anstieg der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin-Konzentration, welche die Ausgangswerte noch überschritt (Abb. 24A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots bestätigte diese Beobachtungen nicht nur, sondern zeigte, dass der Konzentrationsanstieg der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrinrezeptoren sogar über dem Ausgangswert lag, jedoch unter der Verwendung von 100 ng/ml IGF-I oder 100 ng/ml TGF- $\beta$ 1 einen Sättigungspunkt zu erreichen schien (Abb. 24A,B III). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

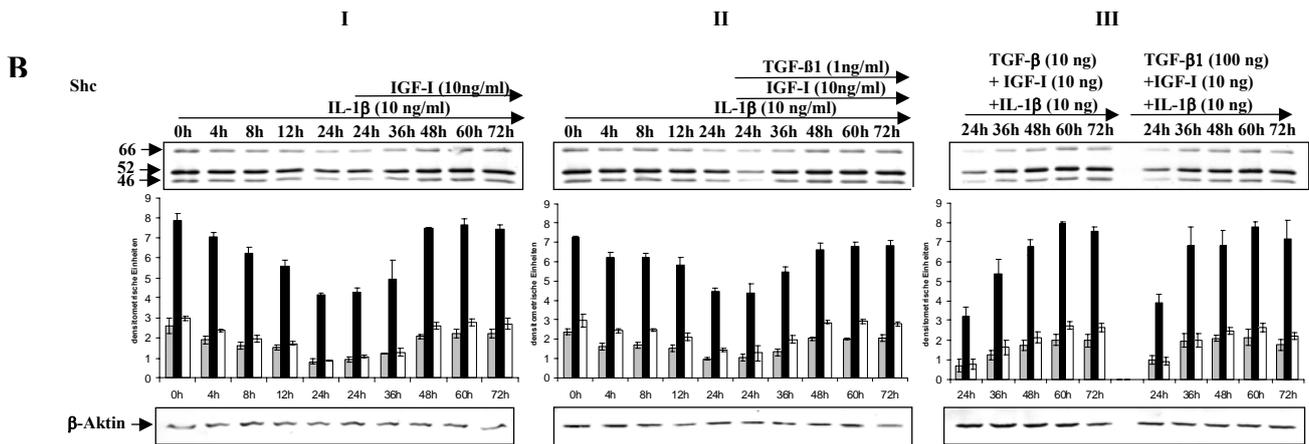




**Abb. 24:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

Das Adapterprotein Shc steht, wie bereits erwähnt, am Anfang zahlreicher Signalkaskaden (unter anderem der MAPKinase) und nimmt hier eine wichtige Rolle als intrazellulärer Signalvermittler ein. Nach wie oben beschriebener Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  gefolgt von einer Ko-Stimulation mit entweder IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 25A,B I) oder mit einer Kombination beider Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 25A,B II-III) kam es zu einer deutlichen Zunahme der Shc-Expression. Die Ko-Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren in erhöhten Konzentrationen führte zu einer weiter gesteigerten Shc-Expression (Abb. 25A,B III). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Expression von Shc bereits nach 24-stündiger Ko-Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren wieder deutlich zunahm (Abb. 25 A,B I-II). Die Steigerung war kontinuierlich über den weiteren Verlauf zu beobachten, am stärksten jedoch in der Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in der höchsten Konzentration mit jeweils 100 ng/ml (Abb. 25A,B III). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

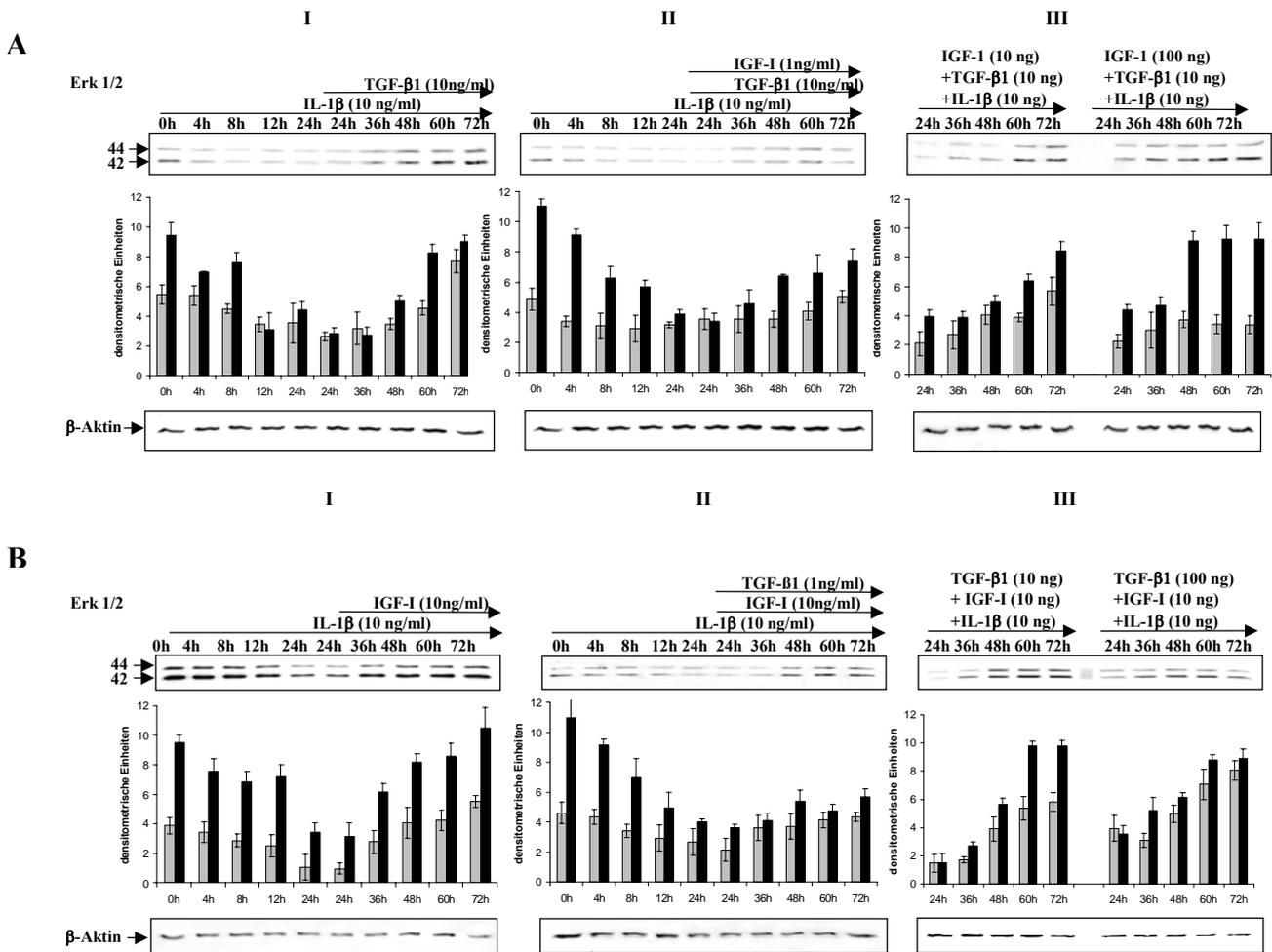




**Abb. 25:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme der Shc-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

Im Rahmen der Signalübertragung in Chondrozyten spielt die MAPKinase Erk 1/2 eine wichtige Rolle. Durch Phosphorylierung wird diese aktiviert und führt somit zu einer weiteren Aktivierung des MAPKinase Signalweges. Wie beschrieben, wurden die emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur zunächst für 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Danach erfolgte eine gleichzeitige Stimulation (Ko-Stimulation) sowohl mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als auch mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 (beide in unterschiedlichen Konzentrationen) für weitere 48 Stunden.

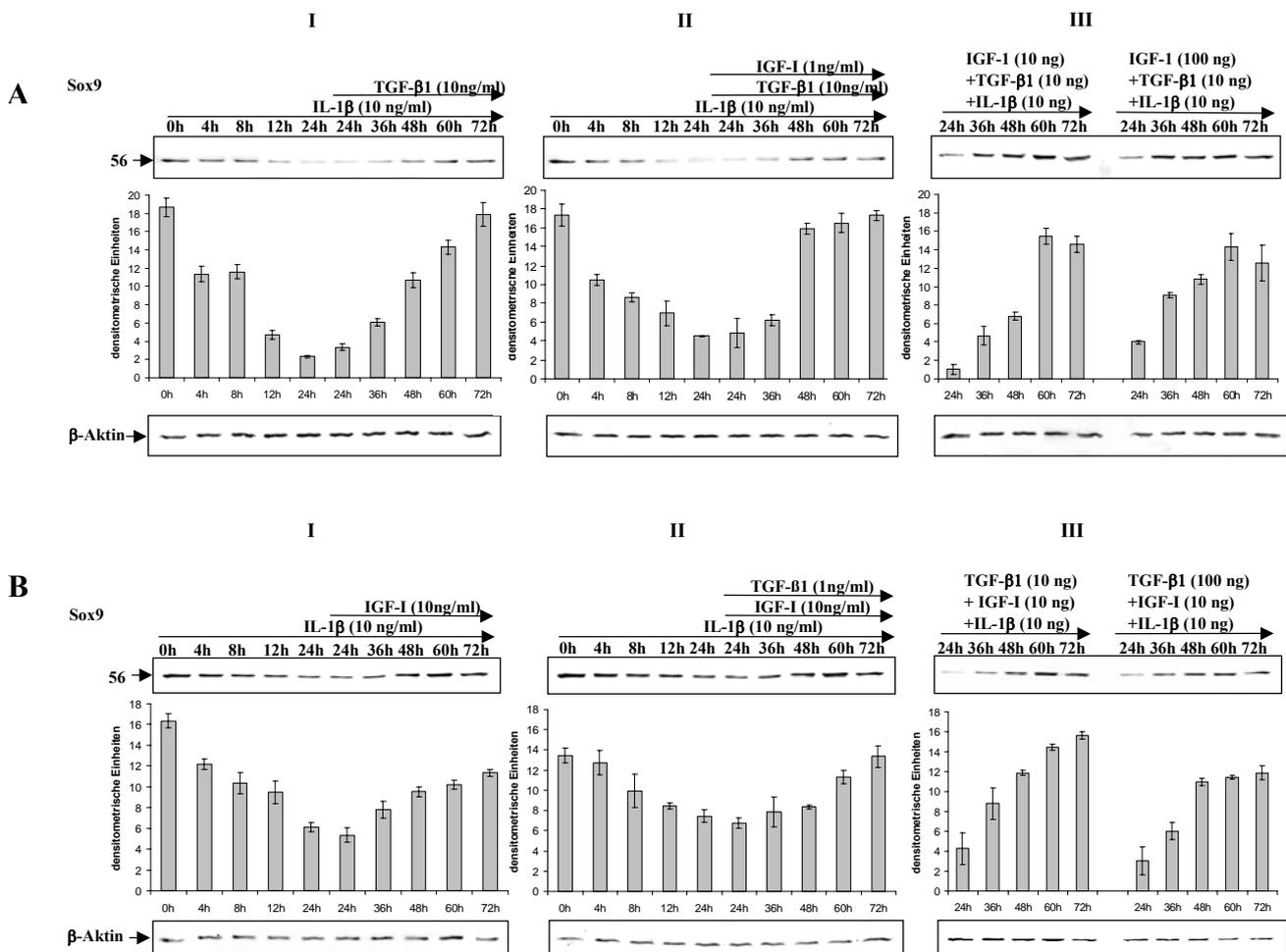
Die Konzentration von Erk 1/2 wurde durch die IL-1 $\beta$ -Stimulation deutlich vermindert. Dies betraf vor allem die 42 kDa Isoform, welche im Vergleich zu der 44 kDa Isoform stärker durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  herabreguliert wurde (Abb. 26 A,B I-III). Die Ko-Stimulation mit entweder IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 26A,B I) oder einer Kombination beider Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 26A,B II-III) hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Erk-Konzentration (vor allem der 42 kDa Isoform) schon nach 24-stündiger Ko-Stimulation. Höhere Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren bewirkten einen noch deutlicheren Anstieg der Erk-Expression (Abb. 26A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte, eine kontinuierliche Steigerung im Verlauf der Ko-Stimulation und nach 48 Stunden Ko-Stimulation den deutlichen Konzentrationsanstieg aktivierter Erk 1/2 im Vergleich zum Anfang. In höheren Konzentrationen schienen die Wachstumsfaktoren zu einem steady state der Erk-Expression zu führen. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 26:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme der Erk 1/2-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

Wie bereits in einer Studie im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunoprecipitation gezeigt werden konnte, besteht im MAPKinase Signalübertragungsweg eine direkte Assoziation zwischen aktivierter Erk 1/2 und dem chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 (Shakibaei et al., 2006), der wiederum nach seiner Translokation in den Zellkern wichtige chondrozytenspezifische Gene aktiviert. Daher war es von großem Interesse den potentiellen Synergismus von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von Sox9 in den mit IL-1 $\beta$  stimulierten emigrierten Chondrozyten zu untersuchen. Hierzu wurden, wie bereits beschrieben, emigrierte Chondrozyten zunächst 24 Stunden in Monolayer-Kultur mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen ko-stimuliert.

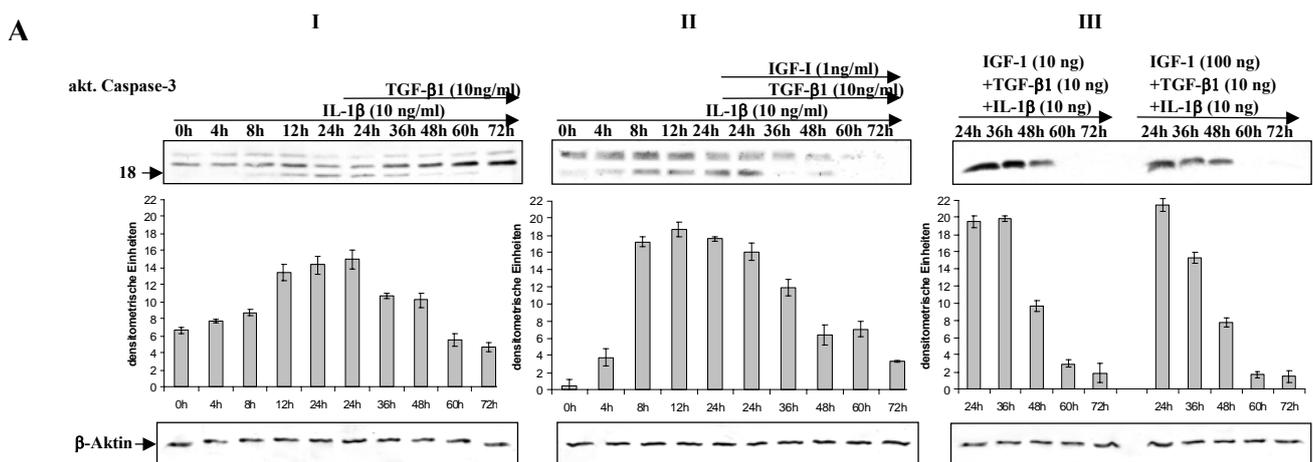
Die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 wurde zunächst durch die 24-stündige IL-1 $\beta$ -Behandlung deutlich vermindert (Abb. 27A,B I-III). Die Ko-Stimulation mit entweder IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 27A,B I) oder mit beiden Wachstumsfaktoren in Kombination und unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 27A,B II-III) hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Sox9-Konzentration schon nach 24-stündiger Ko-Stimulation. Am stärksten war ein additiver Effekt der Wachstumsfaktoren nach Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zu beobachten (Abb. 27A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine kontinuierliche Steigerung der Sox9-Konzentration im Verlauf der Ko-Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren. Eine weitere Erhöhung von IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 schien zu einem Sättigungspunkt zu führen (Abb. 27A,B III). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

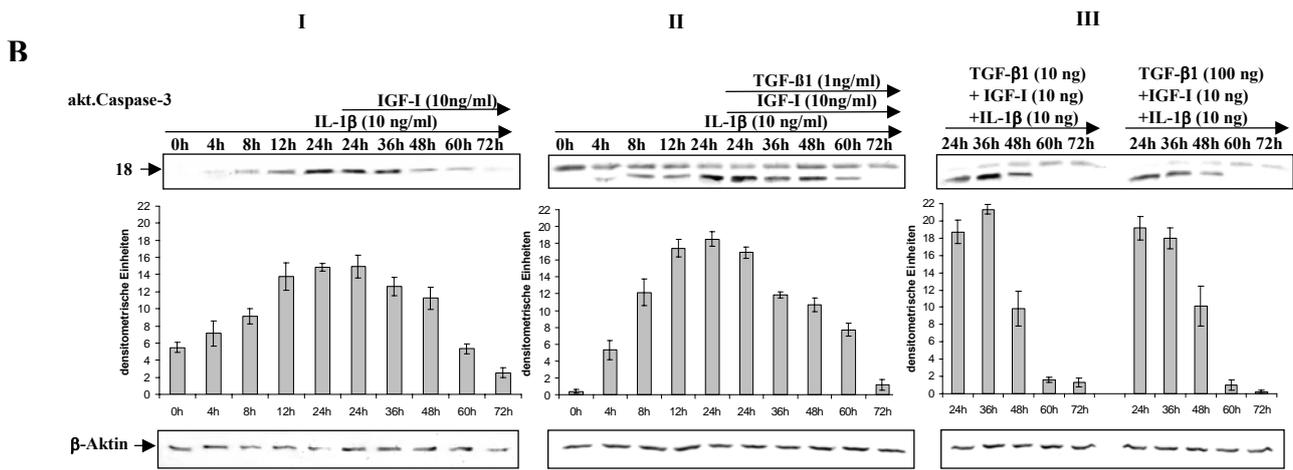


**Abb. 27:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Zunahme der Sox9-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

In den vorangegangenen Untersuchungen konnten bereits deutlich anti-apoptotische Effekte von IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 im Einzelnen sowohl auf ultrastruktureller als auch auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. Ziel der weiteren Analysen war es nun den potentiellen Synergismus beider Wachstumsfaktoren in verschiedenen Kombinationen auf Konzentrationsveränderungen wichtiger mit degenerativen und apoptotischen Prozessen assoziierter Proteine wie aktivierte Caspase-3, verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und das proinflammatorische Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) zu untersuchen. Hierzu wurden, wie bereits beschrieben, emigrierte Chondrozyten zunächst 24 Stunden in Monolayer-Kultur mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen ko-stimuliert.

Nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg aktivierter Caspase-3 (Abb. 28A,B I-III). Die Ko-Stimulation der Chondrozyten mit beiden Wachstumsfaktoren allein (Abb. 28A,B I) oder in Kombination (Abb. 28A,B II-III) führte jedoch bereits nach 12 Stunden zu einer Konzentrationsminderung aktivierter Caspase-3. Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme aktivierter Caspase-3 durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme während der Ko-Stimulation mit IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1, die jedoch am stärksten nach der Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen der Wachstumsfaktoren war (Abb. 28A,B III). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.

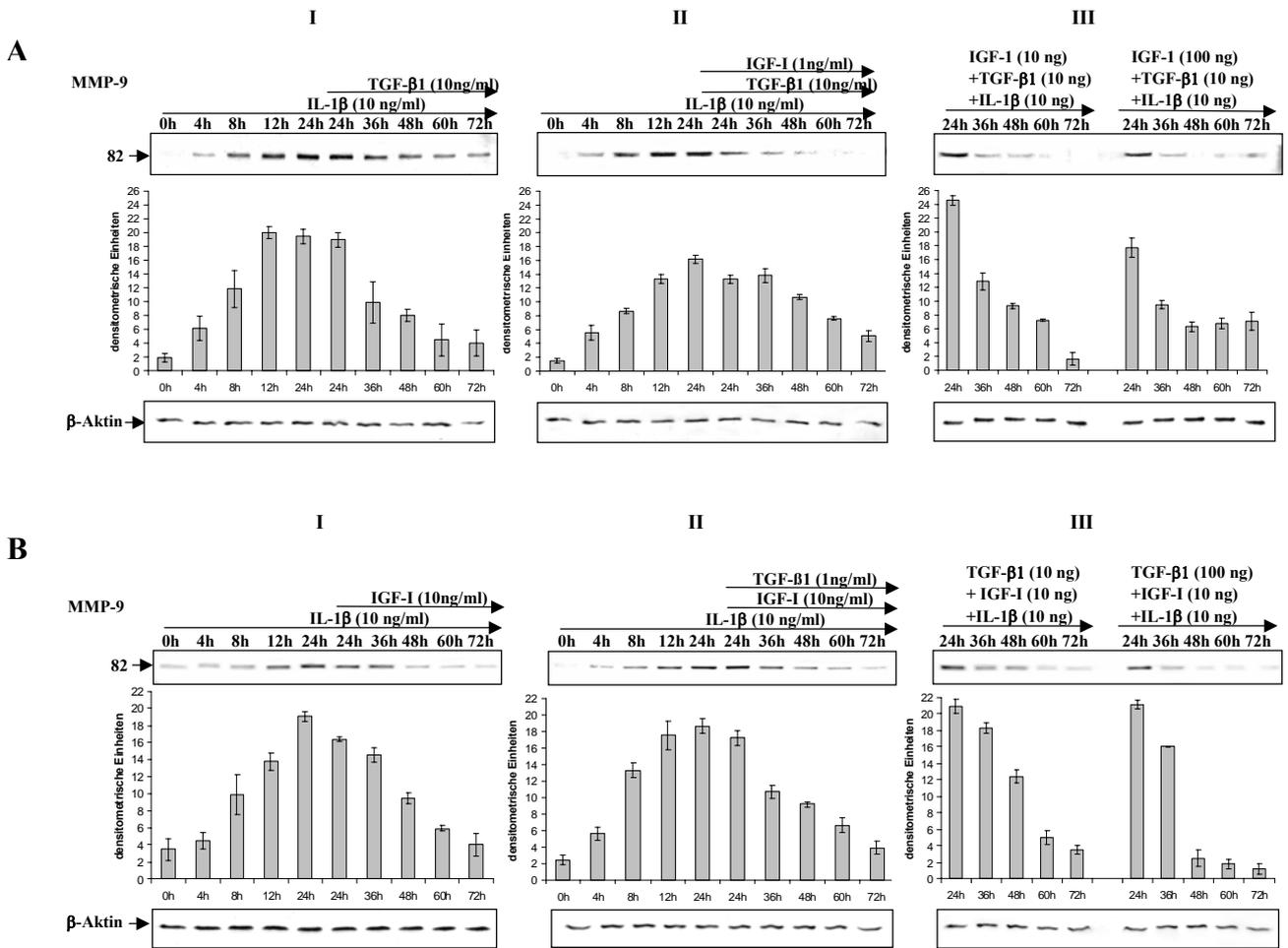




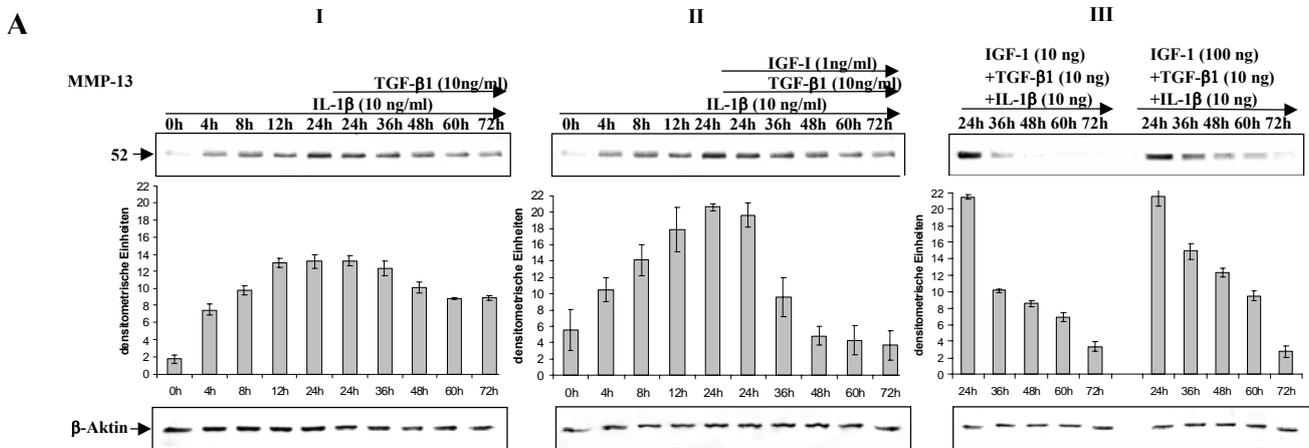
**Abb. 28:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Abnahme der Caspase-3-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

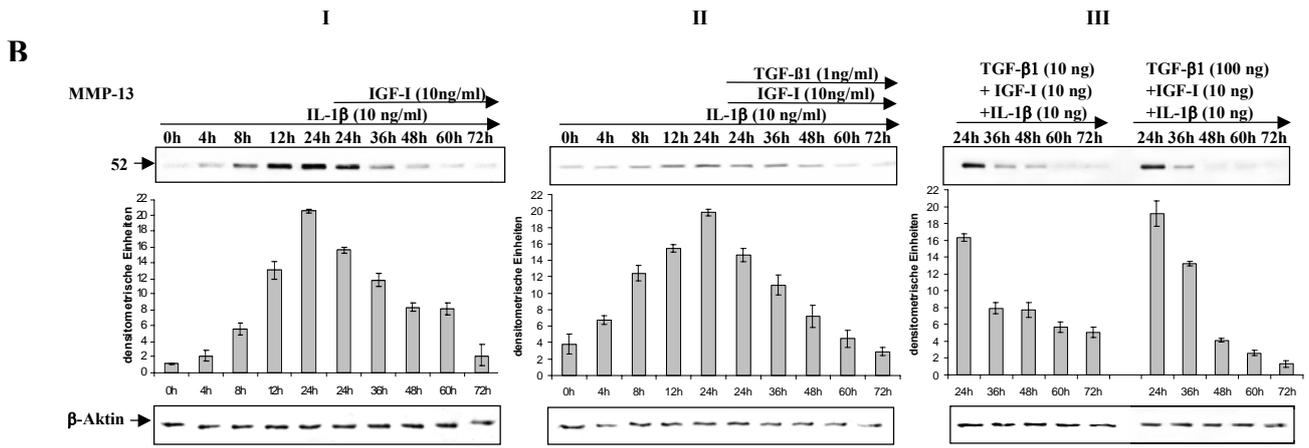
Die Interaktionen zwischen Chondrozyten und ihrer EZM spielen eine essentielle Rolle in der Differenzierung, der Signaltransduktion und dem Überleben der Zellen. Matrix Metalloproteinasen (MMPs) greifen störend in dieses System ein und bewirken den direkten Abbau extrazellulärer Matrixproteine. Weiterhin wurde nun untersucht, ob die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zu einer synergistischen und somit stärkeren Hemmung der MMPs führen kann.

Nach wie oben beschriebener 24-stündiger Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  kam es zu einem deutlichen Anstieg von MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-13 (Kollagenase 3) (Abb. 29/30A,B I-III). Durch die Ko-Stimulation der Chondrozyten mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 29/30A,B I) oder der Kombination beider Wachstumsfaktoren (Abb. 29/30A,B II-III) nahm die Konzentration beider MMPs wieder deutlich ab. Die Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen der Wachstumsfaktoren führte bereits nach zwölf Stunden Ko-Stimulation zu einer noch deutlicheren und rascheren Abnahme der MMP-Expression (Abb. 29/30 A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme der MMP-Konzentrationen durch die IL-1 $\beta$  Behandlung, sowie eine signifikante Abnahme während der Ko-Stimulation mit IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1, die am deutlichsten nach der Ko-Stimulation mit höheren Konzentrationen der Wachstumsfaktoren war (Abb. 29/30A,B III). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



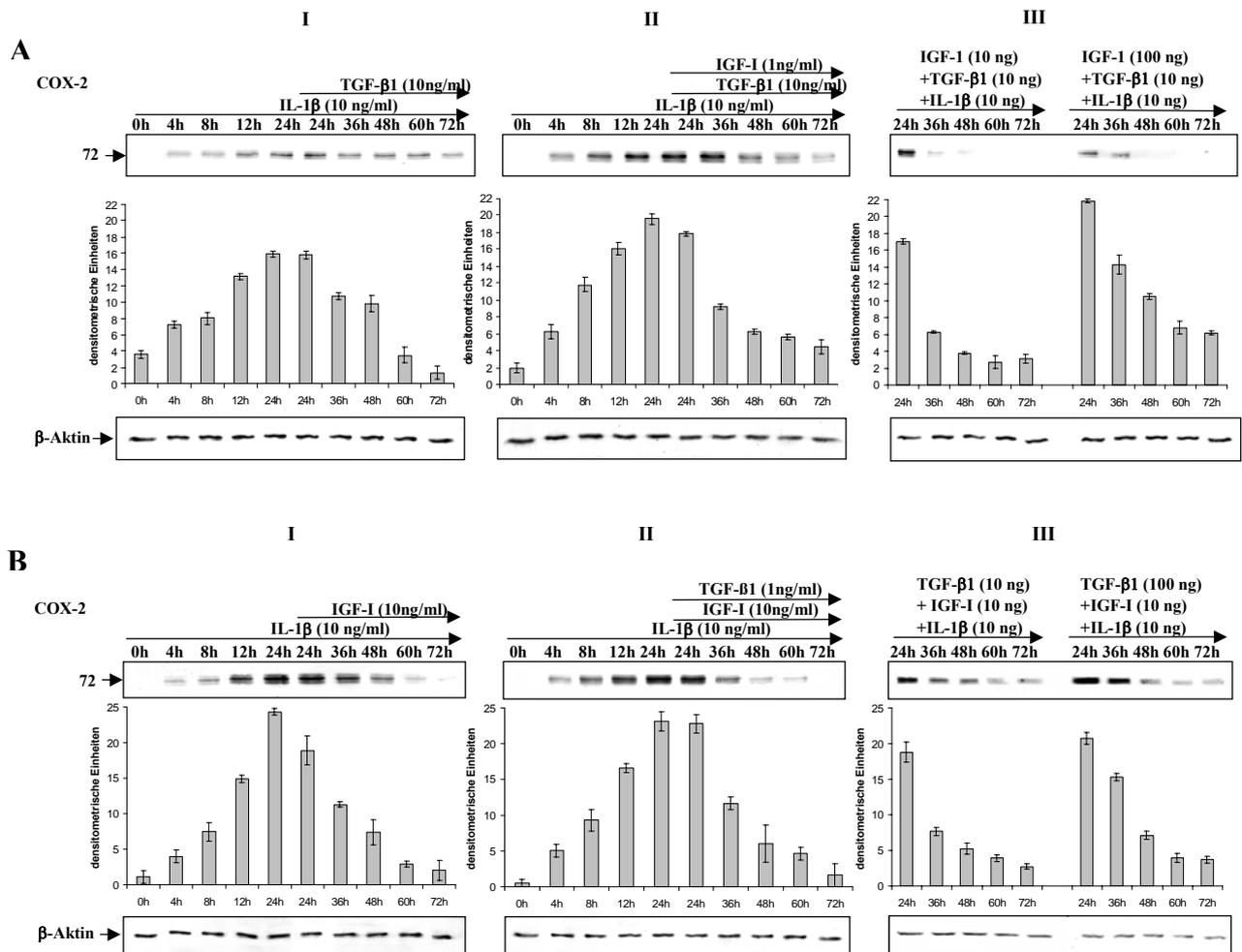
**Abb. 29:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1β für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1β und IGF-I und TGF-β1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Abnahme der MMP-9-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF-β1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF-β1 (1, 10, 100 ng/ml).





**Abb. 30:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Abnahme der MMP-13-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF- $\beta$ 1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng/ml).

Weiterhin wurde der synergistische Effekt von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Expression des proinflammatorischen Enzyms COX-2 untersucht. Hierzu wurden die Chondrozyten, wie oben beschrieben, zunächst 24 Stunden mit IL-1 $\beta$  behandelt und danach erfolgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein (Abb. 31A,B I) oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination und unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 31A,B II-III). Bereits nach vierstündiger IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg der COX-2-Expression in den Chondrozyten (Abb. 31A,B I-III). Im Gegensatz dazu kam es bereits nach zwölfstündiger Ko-Stimulation mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination wieder zu einer signifikanten Konzentrationsabnahme, welche jedoch nach Ko-Stimulation mit erhöhten Konzentrationen beider Faktoren am stärksten war (Abb. 31A,B III). Die densitometrische Auswertung der in dreifacher Form angefertigten Westernblots zeigte eine deutliche Zunahme der COX-2-Expression durch die IL-1 $\beta$ -Behandlung, sowie bereits nach zwölf Stunden eine signifikante Abnahme durch die Ko-Stimulation mit den Wachstumsfaktoren. Besonders auffällig war, dass bereits nach zwölf Stunden Ko-Stimulation mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Kombination nur noch etwa ein Drittel der COX-2-Konzentration vorhanden war, wohingegen erhöhte Konzentrationen der Wachstumsfaktoren diesen Effekt erst nach 24 Stunden Ko-Stimulation bewirkten. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unbeeinflusst.



**Abb. 31:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1β für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1β und IGF-I und TGF-β1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 48h. Deutliche Abnahme der COX-2-Expression durch Wachstumsfaktoren. **A:** konstante Konzentration von TGF-β1; variierende Konzentrationen von IGF-I (1, 10, 100 ng/ml); **B:** konstante Konzentration von IGF-I, variierende Konzentrationen von TGF-β1 (1, 10, 100 ng/ml).

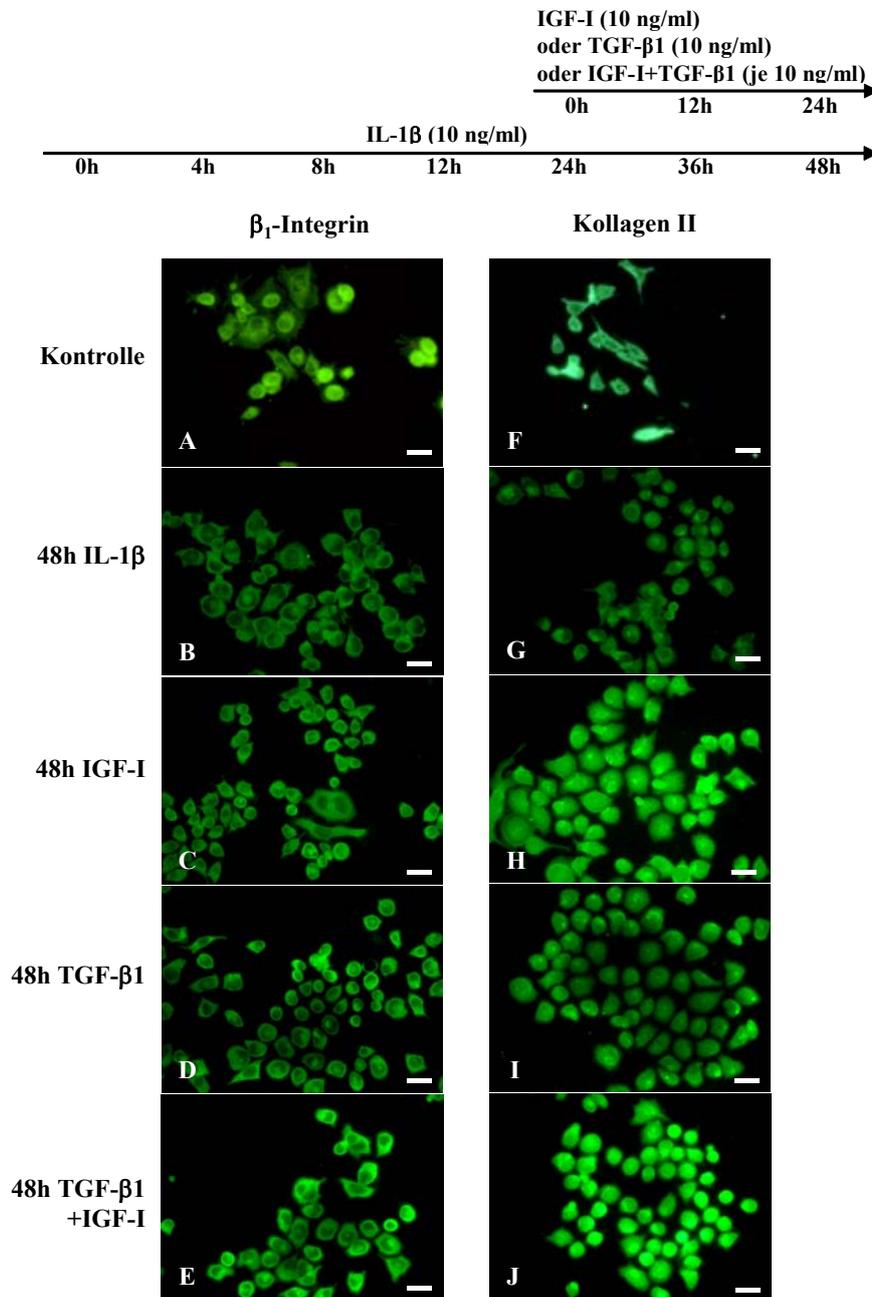
#### 4.3.4. Immunfluoreszenz – Darstellung von Kollagen Typ II und β<sub>1</sub>-Integrin in Chondrozyten in Monolayer-Kulturen

Zur weiteren Veranschaulichung des Effekts der beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β<sub>1</sub> im Einzelnen oder in Kombination miteinander auf die Expression knorpeltypischer Marker, wie dem extrazellulären Matrixprotein Kollagen Typ II und dem Adhäsions- und Transmembranprotein β<sub>1</sub>-Integrin, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die emigrierten Chondrozyten zunächst 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1β vorstimuliert und anschließend mit 10 ng/ml IL-1β und 10 ng/ml IGF-I (Abb. 32C, H)

oder 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Abb. 32D, I) oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination (beide 10 ng/ml)(Abb. 32E, J) für weitere 24 Stunden ko-stimuliert.

In unstimulierten emigrierten Chondrozyten (Positivkontrolle) konnte eine kräftige Markierung für  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin und Kollagen Typ II auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 32 A, F). Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Expression beider Proteine (Abb. 32B, G). Durch die Ko-Stimulation mit IGF-I kam es zu einer starken Zunahme der Expression beider Proteine (Abb. 32C, H). Vor allem die Expression von Kollagen Typ II stieg, wohingegen IGF-I einen geringeren Effekt auf die Steigerung der  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin-Expression hatte. Auch die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einer stärkeren Expression von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin und Kollagen Typ II auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zu mit IL-1 $\beta$  stimulierten Chondrozyten (Abb. 32D, I). Dennoch war die Markierung schwächer ausgeprägt als bei alleiniger Stimulation mit IGF-I. Zur Untersuchung eines synergistischen Effekts von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 wurden die emigrierten Chondrozyten zusätzlich mit beiden Wachstumsfaktoren in Kombination in einer Konzentration von 10 ng/ml behandelt. Die Ergebnisse zeigten starke Immunmarkierungen für  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin und Kollagen Typ II (Abb. 32E, J). Diese waren für beide Proteine im Vergleich zu separater Stimulation mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 deutlich kräftiger ausgeprägt, wobei die Markierung für Kollagen Typ II noch kräftiger war als die für  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin. Die Expression von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin konzentrierte sich hierbei auf die Zellmembran, welche kräftig fluoreszierte (Abb. 32E). Die Kollagen Typ II-Markierung verteilte sich gleichmäßig stark auf die gesamte Oberfläche aller Chondrozyten und zum Teil in den perizellulären Raum (Abb. 32J).

Die Zellen wurden folgendermaßen behandelt:



**Abb. 32:** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ II und  $\beta_1$ -Integrin auf der Oberfläche humaner emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  für 24h; Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 24h. A-E: Markierung für  $\beta_1$ -Integrin; F-J: Markierung für Kollagen Typ II. Vergrößerung 200x; Bars = 25  $\mu$ m

#### 4.4. Chondrogenese

##### 4.4.1. Kultivierung der emigrierten Chondrozyten aus Monolayer-Kultur in Massenkultur

Eine ausreichende und schnelle Vermehrung von Chondrozyten ist nur in der Monolayer-Kultur möglich. Hier dedifferenzieren die Chondrozyten jedoch zu fibroblastenähnlichen Zellen [156]. In dreidimensionalen Kultursystemen, wie der Alginat- oder der Massenkultur, die den natürlichen Verhältnissen des Gelenkknorpels näher kommen als Monolayer-Kulturen, halten Chondrozyten über lange Zeit ihren spezifischen Phänotyp aufrecht [21]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in der Monolayer-Kultur dedifferenzierte Chondrozyten für eine gewisse Zeit (Passage eins bis vier) trotz phänotypischer Veränderungen noch redifferenzierbar sind, wenn sie in ein dreidimensionales Kultursystem wie die Alginat- oder die Massenkultur überführt werden [25,78]. Unter Verwendung von Wachstumsfaktoren (IGF-I) konnte das Redifferenzierungspotential der Chondrozyten nach Überführung in die Massenkultur noch bis Passage sieben verlängert werden [77]. Die Massenkultur bietet den Chondrozyten somit die Möglichkeit in einer dreidimensionalen Kultur ähnlich den *in vivo* Bedingungen zu wachsen und ihren chondrogenen Phänotyp wiederzuerlangen und diesen aufrechtzuerhalten. Nach einer Kultivierungsdauer von drei Wochen *in vitro* setzen aber auch hier Dedifferenzierungsprozesse ein [24].

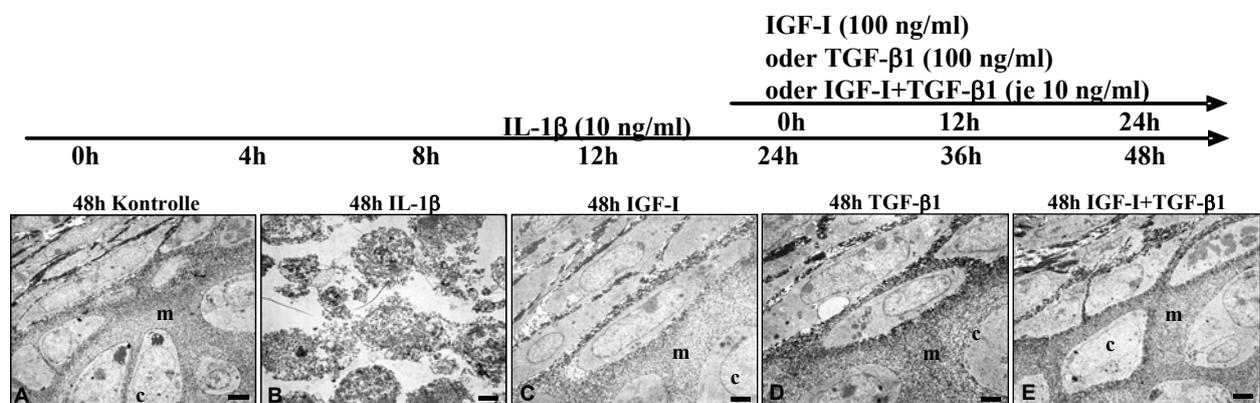
Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte in einem weiteren Versuchsansatz das Potential dedifferenzierter Chondrozyten aus der Monolayer-Kultur zur Bildung einer extrazellulären Matrix in Massenkultur untersucht werden. Hierzu wurden emigrierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert, um anschließend mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I (100 ng/ml) oder TGF- $\beta$ 1 (100 ng/ml) oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination für weitere 24 Stunden ko-stimuliert zu werden. Die so stimulierten Chondrozyten wurden im Anschluss in Massenkultur kultiviert. Hier verblieben sie für weitere sieben Tage. Die morphologischen Veränderungen wurden elektronenmikroskopisch ausgewertet. Die Kulturen wurden auf elektronenmikroskopischer, immun-elektronenmikroskopischer und Westernblot Ebene untersucht.

Unbehandelte Chondrozyten (Positivkontrolle) zeigten das Bild gut differenzierter Zellen mit gut ausgebildeten und organisierten Zellorganellen. Die Chondrozyten bildeten ein dichtes und regelmäßiges extrazellulären Matrixkonstrukt (Abb. 33A). Dedifferenzierte Chondrozyten, die aus allein mit IL-1 $\beta$  stimulierten Monolayer-Kulturen stammten, waren auch nach Überführung in die Massenkultur nicht in der Lage zu redifferenzieren. Sie produzierten keine EZM und

unterlagen stattdessen der Apoptose. Deutlich apoptotische Veränderungen stellten in diesem Zusammenhang die Chromatinverdichtung, das Lösen des Zytoplasmas vom Zellkern sowie die Präsenz von Apoptosekörperchen dar (Abb. 33B).

Im Unterschied dazu waren die mit Wachstumsfaktoren behandelten dedifferenzierten Chondrozyten der Monolayer-Kultur nach sieben Tagen in Massenkultur zu Chondrozyten redifferenziert. Diese zeigten den typischen ovalen bis runden Phänotyp. Im Zytoplasma befand sich gut ausgebildetes rER, ein großer Golgi Apparat sowie zahlreiche Mitochondrien. Die von den Chondrozyten gebildete extrazelluläre Matrix, bestehend aus feinen Kollagenfibrillen, legte sich dicht an die Zellmembran an (Abb. 33A, C-E).

Die Zellen wurden folgendermaßen behandelt:

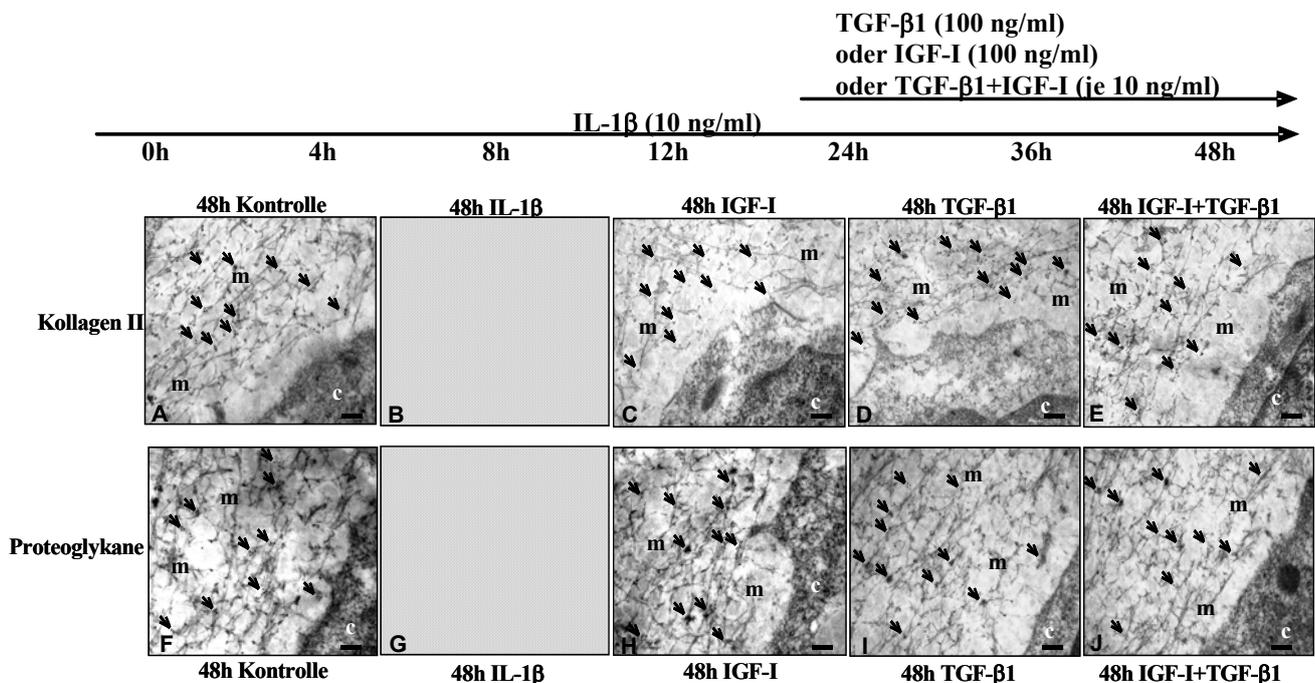


**Abb. 33:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1β und Ko-Stimulation mit IL-1β und IGF-I oder/und TGF-β1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. m=Matrix; c=Chondrozyt. A-E: x4000; Bars = 1 μm

Durch das Überführen in die Massenkultur waren mit Wachstumsfaktoren behandelte emigrierte Zellen aus der Monolayer-Kultur in der Lage zu redifferenzieren. Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, waren die Chondrozyten in den entstandenen Knorpelknötchen von reichlich gut ausgebildeter dichter extrazellulärer Matrix umgeben. Um nachzuweisen, dass es sich hierbei tatsächlich um die knorpeltypischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Proteoglykane handelt, wurden immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit goldmarkierten Antikörpern gegen Kollagen Typ II und Proteoglykane durchgeführt (Abb. 34). Zunächst wurden die emigrierten Chondrozyten für 24 Stunden mit IL-1β (10 ng/ml) in Monolayer-Kultur vorbehandelt und anschließend mit IL-1β (10 ng/ml) und IGF-I oder TGF-β1 (jeweils 100 ng/ml) oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination (beide 10 ng/ml) für

weitere 24 Stunden ko-stimuliert. Danach erfolgte der Transfer in die Massenkultur, wo die Chondrozyten für weitere sieben Tage verweilten.

In unbehandelten emigrierten Chondrozyten in Massenkultur (Positivkontrolle) konnten beide knorpelspezifischen Matrixbestandteile nachgewiesen werden. Die Goldpartikel waren sowohl für Kollagen Typ II als auch für Proteoglykane im Extrazellularraum nachweisbar. Eine Markierung von Goldpartikeln im Intrazellularraum wies auf Vorstufen von Kollagen Typ II und der Proteoglykane im Syntheseapparat der Chondrozyten hin (Abb. 34A,F). Wie bereits gezeigt werden konnte, führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  in Monolayer-Kultur zu einem völlig zerstörten Zellbild der Chondrozyten in Massenkultur. Die Immunmarkierung gegen Kollagen Typ II und Proteoglykane wurde deshalb nicht durchgeführt (Abb. 34B,G). Im Unterschied dazu zeigte sich die Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 nicht nur auf das veränderte Zellbild redifferenzierter Chondrozyten mit dem typischen ovalen bis runden Phänotyp sowie den gut ausgeprägten und organisierten Zellorganellen. Durch Immunmarkierung mit goldgekoppelten Antikörpern konnten die Matrixproteine Kollagen Typ II und Proteoglykane zahlreich im Extrazellularraum nachgewiesen werden. Dies war sowohl für die Ko-Stimulation mit IGF-I (Abb. 34C, H) als auch mit TGF- $\beta$ 1 (Abb. 34D, I) zu erkennen. Am stärksten ausgeprägt war die Immunmarkierung beider Matrixproteine jedoch nach der Ko-Stimulation der Chondrozyten mit beiden Wachstumsfaktoren in Kombination miteinander (Abb. 34E, J).

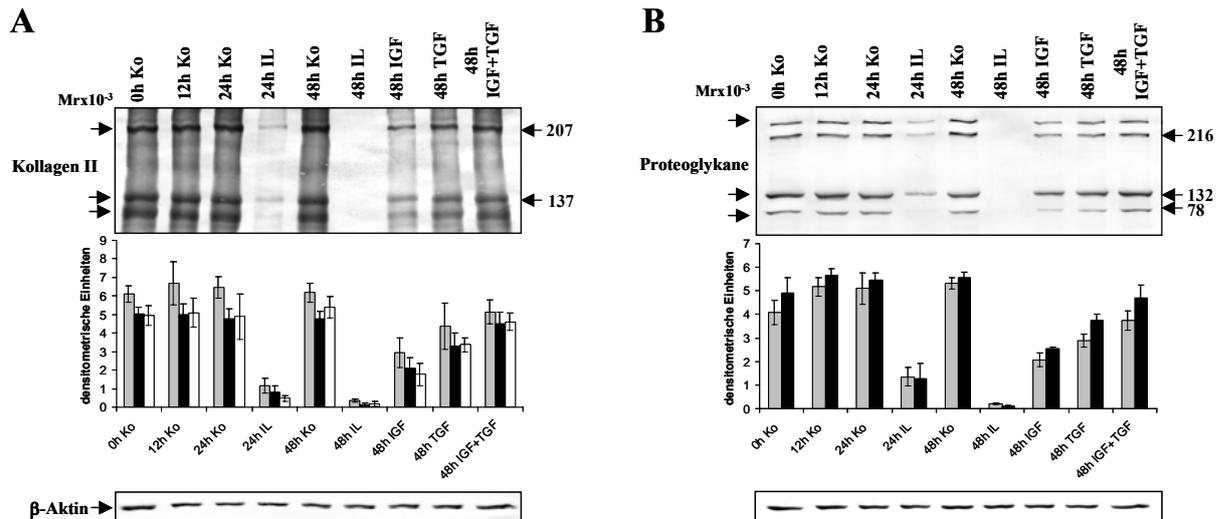


**Abb. 34:** Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. Immunmarkierung gegen Kollagen II und Proteoglykane ( $\rightarrow$ ). m=Matrix; c=Chondrozyt A-J: x25000; Bars 1 $\mu$ m

Um den Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Synthese der extrazellulären Matrixproteine in redifferenzierten Chondrozyten in Massenkultur auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden humane emigrierte Chondrozyten 24 Stunden in Monolayer-Kultur mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1 (beides 10 ng/ml) ko-stimuliert oder nur mit IL-1 $\beta$  behandelt. Die so behandelten Zellen wurden in Massenkultur überführt und hier für weitere sieben Tage kultiviert.

Die Westernblot Analysen ergaben eine starke Expression von Kollagen Typ II und Proteoglykanen (Abb. 35A,B) in Chondrozyten, die unbehandelt waren (0, 12, 24 und 48 Stunden Kontrolle), im Gegensatz zu Kulturen, die ausschließlich mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden. Hier konnten für beide Proteine nur geringe oder keine Expressionen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit IGF-I resultierte in einer gesteigerten Expression von Kollagen Typ II (Abb. 35A) sowie den Proteoglykanen (Abb. 35B), welche weiter durch die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 verstärkt wurde. Durch die Kombination beider Wachstumsfaktoren konnte ein additiver Effekt auf die Expression beider Matrixproteine gezeigt werden. Hier war die Expression sowohl von Kollagen Typ II als auch der Proteoglykane am stärksten und erreichte beinahe den Ausgangswert.

In den densitometrischen Analysen der in dreifacher Form angefertigten Westernblot Experimente zeigten sich in mit Wachstumsfaktor behandelten Chondrozyten erhöhte Expressionen von Kollagen Typ II und der Proteoglykane verglichen mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen nach Transfer in Massenkultur. Dabei bewirkte die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 einen signifikanten Anstieg in der Expression beider Matrixproteine verglichen mit der Ko-Stimulation mit nur einem beider Wachstumsfaktoren. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unverändert.



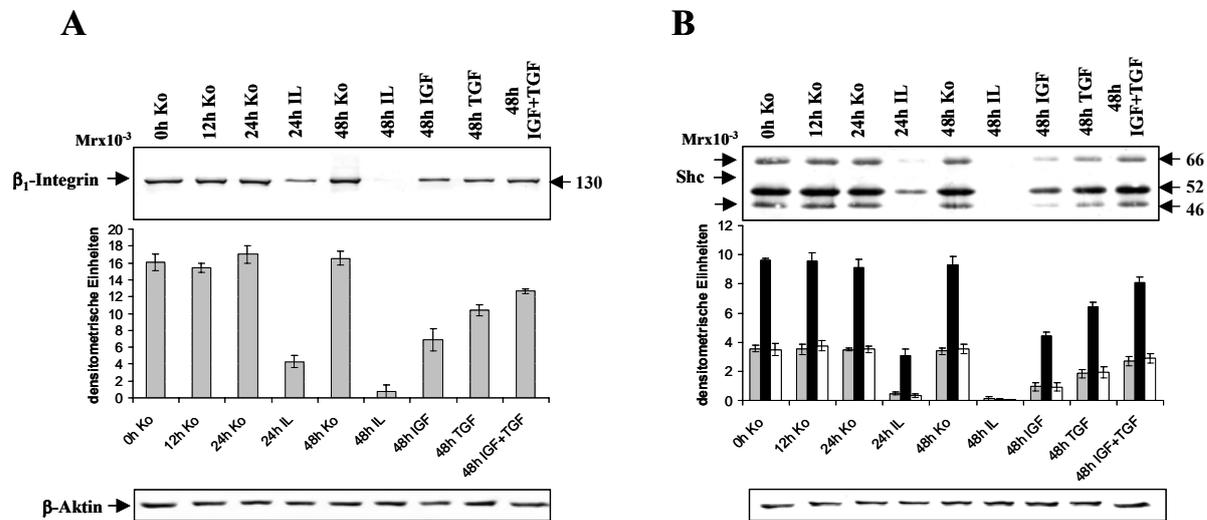
**Abb. 35:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. Deutlicher Anstieg der Expression von Kollagen Typ II (A) und knorpelspezifischen Proteoglykanen (CSPG) (B) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Bei Proteoglykanen wurden exemplarisch die unteren zwei Banden gemessen.

Desweiteren wurde der Effekt von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Expression des transmembranären Rezeptor- und Signalproteins  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin und des Adaptorproteins Shc nach Transfer in Massenkultur untersucht. Humane emigrierte Chondrozyten wurden für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  in Monolayer-Kultur vorstimuliert. Danach folgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1 (beides 10 ng/ml) oder die Chondrozyten wurden nur mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Die so behandelten Zellen wurden in Massenkultur überführt und hier für weitere sieben Tage kultiviert.

Die Expression von sowohl  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin (Abb. 36A) als auch Shc (Abb. 36B) war in unbehandelten Chondrozyten (0, 12, 24 und 48 Stunden Kontrolle) hoch, zeigte jedoch deutlich verringerte Werte nach 24 Stunden Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Nach 48 Stunden IL-1 $\beta$ -Behandlung war keine Expression mehr sichtbar. Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung mit IGF-I in einer deutlichen Zunahme der Expression beider Proteine, die weiter durch die Ko-Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 gesteigert wurde. Die Kombination beider Wachstumsfaktoren zeigte die stärkste Expression von sowohl  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin als auch von Shc-Protein.

In den densitometrischen Analysen der in dreifacher Form angefertigten Westernblot Experimente zeigten sich in mit Wachstumsfaktor behandelten Chondrozyten nach Transfer in Massenkultur erhöhte Expressionen von  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin und Shc verglichen mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen. Dabei bewirkte die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 einen signifikanten Anstieg in

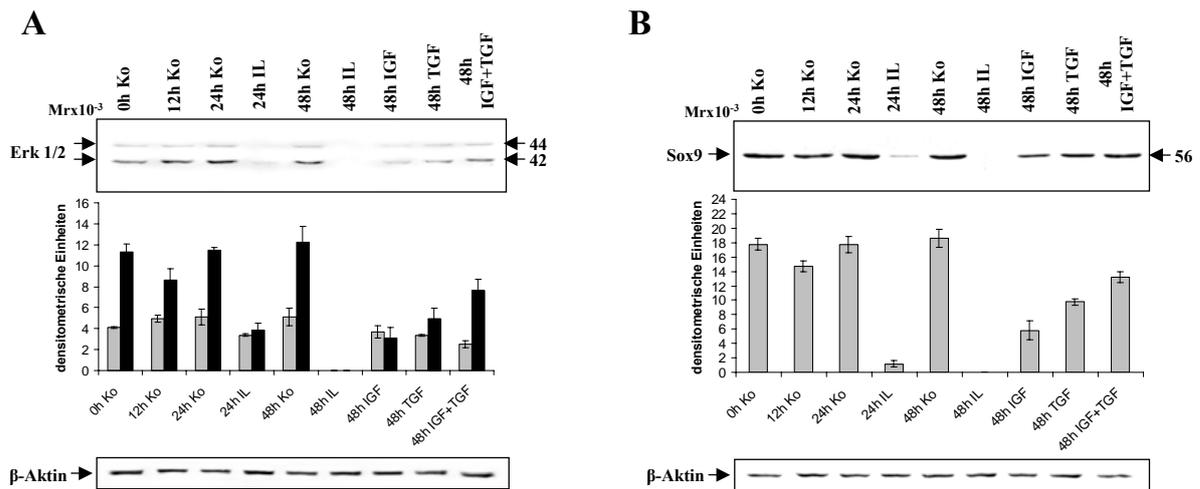
der Expression beider Proteine verglichen mit der Ko-Stimulation mit nur einem der beiden Wachstumsfaktoren (Abb. 36A,B). Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unverändert.



**Abb. 36:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. Deutlicher Anstieg der Expression von  $\beta_1$ -Integrin (A) und Shc (B) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren.

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss beider Wachstumsfaktoren auf die Synthese der für die Chondrogenese wichtiger Signalproteine analysiert werden. Das Interesse galt dabei vor allem der MAPKinase Erk 1/2 und dem chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 in emigrierten Chondrozyten nach dem Transfer in Massenkultur. Hierzu wurden humane emigrierte Chondrozyten zunächst für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  in Monolayer-Kultur vorstimuliert. Danach folgte die Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1 (beides 10 ng/ml) oder die Zellen wurden nur mit IL-1 $\beta$  behandelt. Die so behandelten Zellen wurden in Massenkultur überführt und hier für weitere sieben Tage kultiviert.

Die densitometrische Analyse der in dreifacher Form angefertigten Westernblots demonstrierte zunächst, verglichen mit den Kontrollzellen, eine IL-1 $\beta$  induzierte verminderte Synthese von Erk 1/2 und Sox9 (Abb. 37A,B). Sowohl Sox9 (Abb. 37B) als auch Erk 1/2 (Abb. 37A) waren nach 48 Stunden nicht mehr messbar. Die Stimulation mit IGF-I führte zu einer deutlichen Steigerung der Expressionen beider Proteine, welche durch die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 noch gesteigert wurde. Die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 hatte einen signifikanten additiven Effekt auf die Expression beider Proteine verglichen mit der Ko-Stimulation mit nur einem der beiden Wachstumsfaktoren. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unverändert.



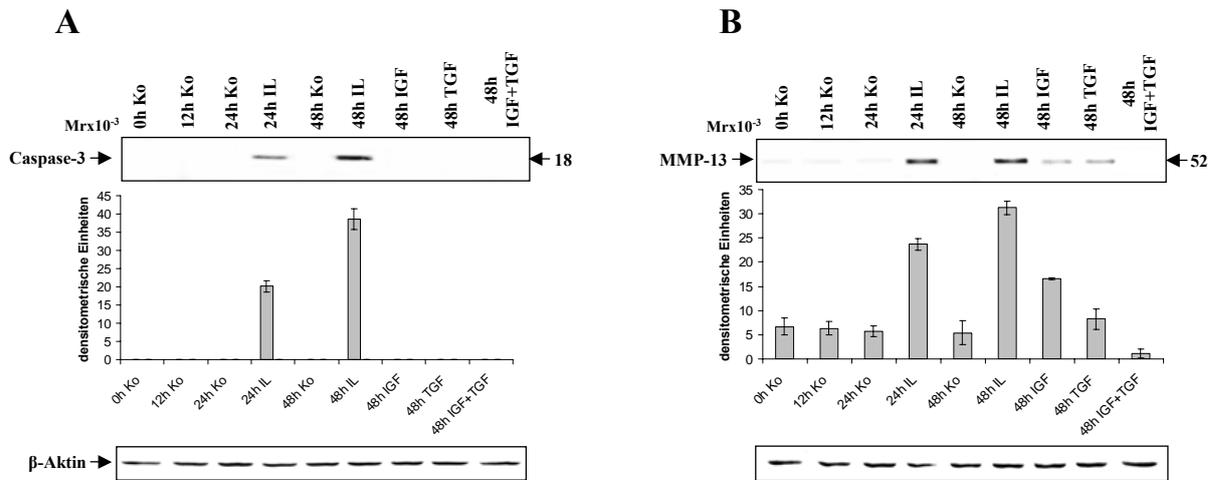
**Abb. 37:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. Deutlicher Anstieg der Expression von Erk 1/2 (A) und Sox9 (B) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren.

Um den starken anabolen Effekt der Wachstumsfaktoren auf die in Monolayer-Kultur durch IL-1 $\beta$  induzierte Dedifferenzierung der emigrierten Chondrozyten in Massenkultur zu demonstrieren, wurde die Expression wichtiger mit Apoptose und Entzündung assoziierter Proteine, wie aktivierter Caspase-3 und MMP-13, untersucht. Humane emigrierte Chondrozyten wurden hierfür zunächst für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  in Monolayer-Kultur vorstimuliert und anschließend mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IGF-I und/oder TGF- $\beta$ 1 (beides 10 ng/ml) ko-stimuliert oder nur mit IL-1 $\beta$  behandelt. Die so behandelten Zellen wurden in Massenkultur überführt und hier für weitere sieben Tage kultiviert.

Wie in Abbildung 38 gezeigt, resultierte die Stimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  nach 24 Stunden in erhöhten Expressionen sowohl von aktivierter Caspase-3 als auch von MMP-13 (Abb. 38A,B). Nach 48 Stunden war die Expression weiter erhöht, für aktivierte Caspase-3 besonders deutlich (Abb. 38A). Die Verwendung von IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 oder beiden Wachstumsfaktoren in Kombination führte zu einer kompletten Herabregulierung der aktivierten Caspase-3. Die Expression von MMP-13 nahm durch die Ko-Stimulation mit IGF-I deutlich ab, noch stärker sogar durch TGF- $\beta$ 1-Ko-Stimulation und war nach der Kombinationsbehandlung mit beiden Wachstumsfaktoren kaum noch erkennbar (Abb. 38B).

Die densitometrischen Analysen der in dreifacher Form angefertigten Westernblot Experimente bestätigten diese Befunde und zeigten, dass die Caspase-3- und MMP-13- Expressionen durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  deutlich im Vergleich zu Kontrollzellen oder mit Wachstumsfaktoren

behandelten Zellen nach dem Transfer in Massenkultur anstiegen. Die Synthese des House-keeping Proteins  $\beta$ -Aktin blieb unverändert.



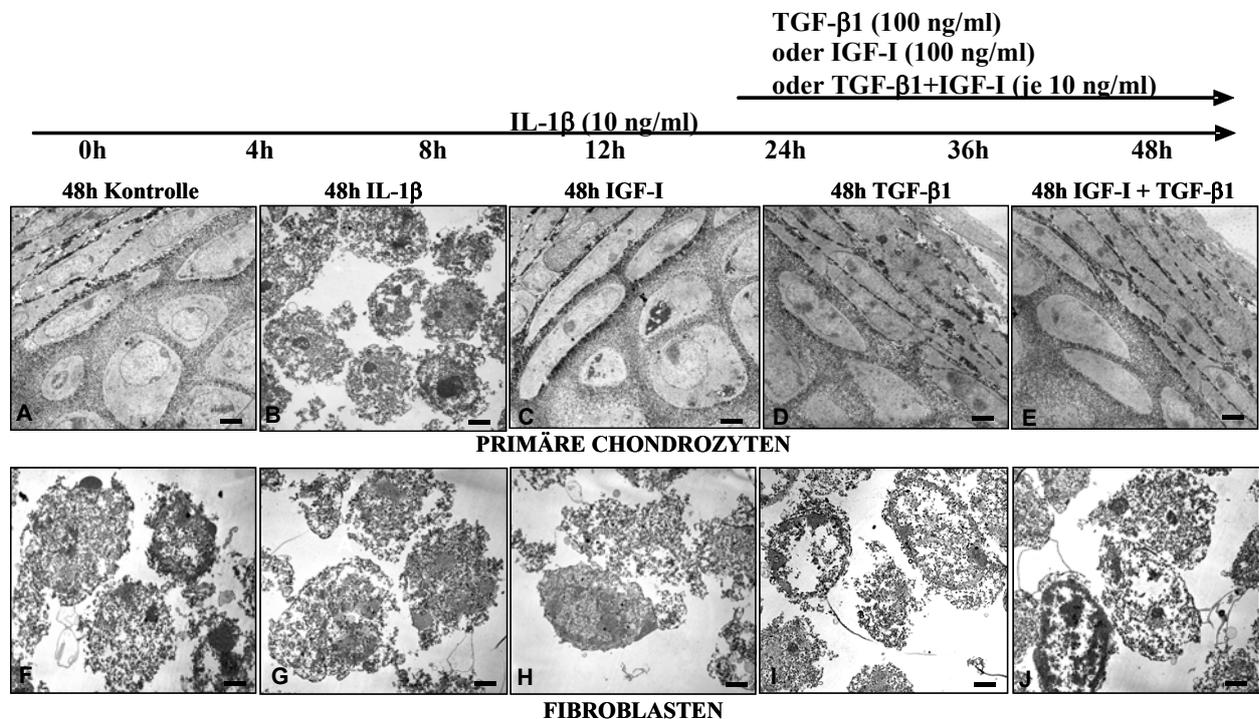
**Abb. 38:** Westernblot Analyse humaner emigrierter Chondrozyten in Massenkultur. 24h Vorstimulation mit IL-1 $\beta$  und Ko-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder/und TGF- $\beta$ 1 für weitere 24h in Monolayer-Kultur. Danach Transfer in Massenkultur für sieben Tage. Deutlicher Anstieg der Expression von Caspase-3 (A) und MMP-13 (B) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren.

#### 4.4.2. Kultivierung von primären Chondrozyten und Fibroblasten in Massenkultur

Um die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit emigrierten Chondrozyten aus der Alginat-Kultur zu verifizieren, wurden dieselben Versuche zum einen mit frisch isolierten primären Chondrozyten (als Positivkontrolle; Abb. 39A-E) und zum anderen mit Fibroblasten (als Negativkontrolle; Abb. 39F-J) durchgeführt. Hierfür wurden serumfreie primäre isolierte Chondrozyten und Fibroblasten zunächst 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 (jeweils 100 ng/ml) oder mit beiden in Kombination (10 ng/ml) ko-stimuliert oder nur mit IL-1 $\beta$  für weitere 24 Stunden weiterstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für sieben Tage in Massenkultur überführt. Die Ergebnisse wurden mittels Elektronenmikroskopie und Westernblot dargestellt.

Die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte sowohl bei primären Chondrozyten als auch bei Fibroblasten zu einem zerstörten Zellbild mit apoptotischen und lysierten Zellen (Abb. 39B,G). Im Gegensatz dazu bewirkte die Ko-Stimulation der primären Chondrozyten mit Wachstumsfaktoren ein gesundes Bild gut ausgebildeter Knorpelknötchen mit vitalen und gut ausgeprägten und organisierten Zellorganellen (Abb. 39C-E). Dies konnte sowohl nach der Ko-Stimulation der primären Chondrozyten mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein oder beiden in Kombination dargestellt werden.

In der Massenkultur der Fibroblasten zeigten sich jedoch komplett zerstörte Zellstrukturen, sowohl bei Stimulation mit IL-1 $\beta$  als auch nach Behandlung mit beiden Wachstumsfaktoren (Abb. 39G-J).

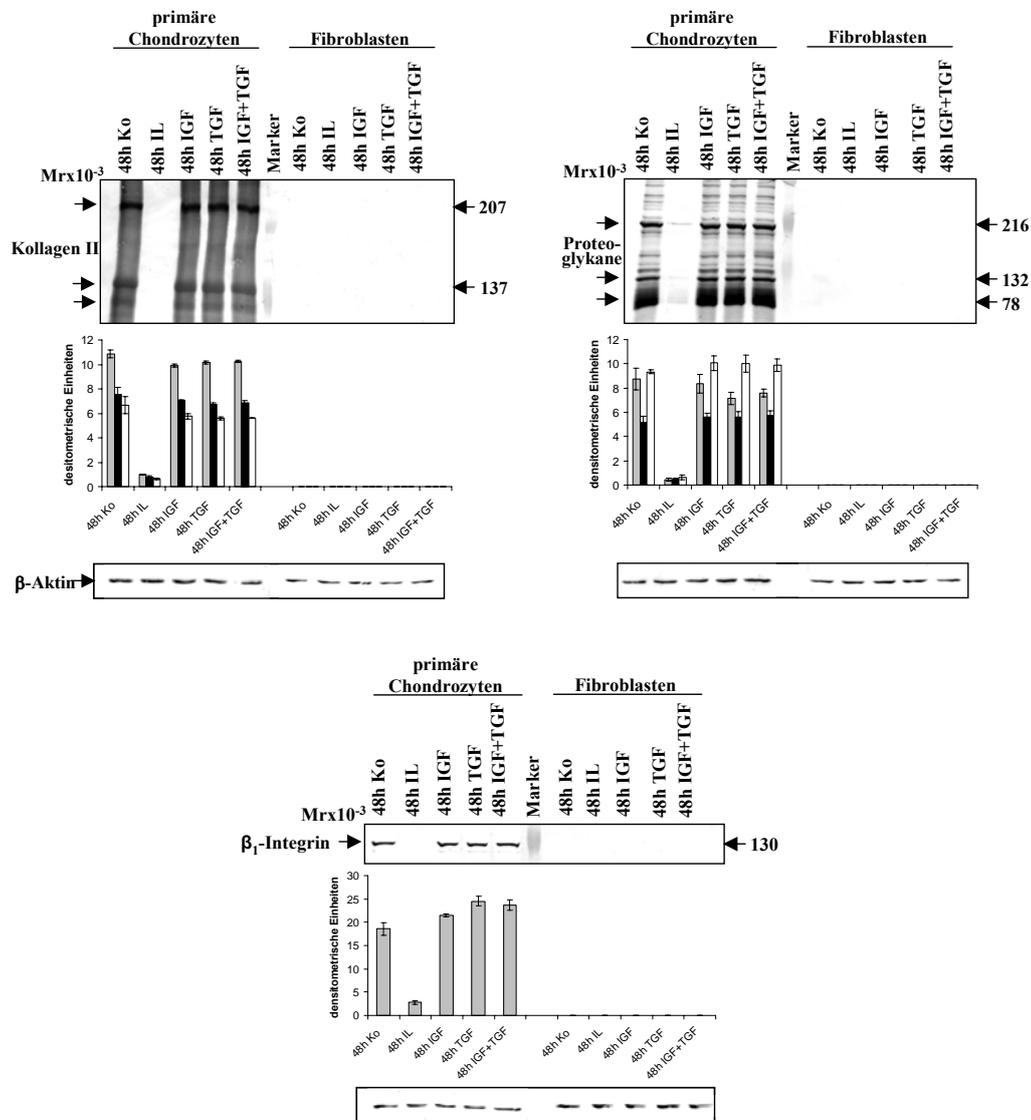


**Abb. 39:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner primärer isolierter Chondrozyten und Fibroblasten in Massenkultur. **B:** Behandlung mit IL-1 $\beta$  führt zu Apoptose der primären isolierten Chondrozyten. **A, C-E:** Ausbildung feiner Knorpelknötchen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren. **F-J:** Völlige Zerstörung der Fibroblasten in allen Kulturbedingungen. A-J: x4000; Bars = 1  $\mu$ m

Zum Untermauern der Ergebnisse aus den elektronenmikroskopischen Demonstrationen wurden weitere Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. In den hierzu durchgeführten Westernblot Analysen wurden Antikörper gegen Kollagen Typ II, Proteoglykane und  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin benutzt (Abb. 40). Zunächst wurden serumfreie primäre isolierte Chondrozyten und Fibroblasten 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  vorstimuliert und anschließend mit IL-1 $\beta$  und IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 (jeweils 100 ng/ml) oder mit beiden in Kombination (10 ng/ml) ko-stimuliert oder nur mit IL-1 $\beta$  für weitere 24 Stunden weiterstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für sieben Tage in Massenkultur überführt.

Es zeigten sich starke Expressionen von Kollagen Typ II, der Proteoglykane und  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin in den Kontrollzellen und in mit Wachstumsfaktoren behandelten primären Chondrozyten. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Expression dieser drei

Proteine. Im Gegensatz dazu war weder eine Expression von Kollagen Typ II noch von Proteoglykanen oder  $\beta_1$ -Integrin in Fibroblasten nachweisbar. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Zellen mit IL-1 $\beta$  oder mit Wachstumsfaktoren behandelt worden waren (Abb. 40).



**Abb. 40:** Westernblot Analyse humaner primärer isolierter Chondrozyten und Fibroblasten in Massenkultur. Expression von Kollagen Typ II, Proteoglykanen und  $\beta_1$ -Integrin. Bei Proteoglykanen wurden exemplarisch drei Banden gemessen.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Kultivierung der Chondrozyten unmittelbar nach der Isolierung in Alginat

Im Rahmen der Therapie von Gelenkknorpelschäden hat die autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht und bereits gute Ergebnisse erzielt. Verwendung findet dieses neue Verfahren bisher jedoch nur für isolierte kleine Knorpeldefekte zum Beispiel nach traumatischen Läsionen [139]. Notwendige Voraussetzung zur Transplantation funktionsfähiger, vitaler Chondrozyten in den artikulären Defekt ist eine ausreichende Menge an transplantierbaren Zellen. Die ausreichende Vermehrung der Chondrozyten ist nur in der Monolayer-Kultur möglich. Hier kommt es jedoch zu Dedifferenzierungsprozessen in den Chondrozyten. Die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Produktion knorpeltypischer Matrixproteine und produzieren stattdessen Kollagen Typ I, III und V sowie knorpelunspezifische Proteoglykane [54]. Hierbei geht der Kontakt der Chondrozyten zur ihrer EZM verloren und die Zellen beginnen Zellfortsätze auszubilden. Nach und nach nehmen sie einen fibroblastenähnlichen Phänotyp an. Die Kontamination mit Fibroblasten oder die Überwucherung durch diese kann zusätzlich zur Dedifferenzierung der Chondrozyten beitragen [157]. Diese phänotypisch bereits dedifferenzierten Chondrozyten haben teilweise ihr chondrogenes Potential verloren. Werden sie in den Knorpeldefekt gefüllt, sind sie oft nicht in der Lage, diesen effizient und dauerhaft zu decken. Die Ergebnisse der ACT sind daher verbesserungswürdig.

Ziel dieser Arbeit war es also, nach Möglichkeiten zu suchen, eine ausreichende Anzahl an Chondrozyten *in vitro* zu gewinnen, das chondrogene Potential dieser Zellen aufrecht zu erhalten und somit Material zu gewinnen, welches im Rahmen der ACT Knorpeldefekte funktionell decken kann. Außerdem sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das chondrogene Potential und das Redifferenzierungspotential von dedifferenzierenden Chondrozyten *in vitro* haben.

Um einen einheitlichen Versuchsansatz mit einer homogenen und vitalen Chondrozytenpopulation für die Untersuchungen in dieser Arbeit zu gewährleisten, wurden emigrierte Zellen aus der Alginat-Kultur verwendet. Für die Untersuchungen mussten die Chondrozyten in der Lage sein schnell zu proliferieren, knorpeltypische Marker zu produzieren und ihr chondrogenes Potential aufrecht zu erhalten. Um dies sicher zu stellen, wurden primäre humane Chondrozyten isoliert und in die Alginat-Kultur überführt. Im Alginat bleiben die Chondrozyten für lange Zeit vital und in einem differenzierten Zustand [154]. Bereits nach wenigen Tagen wandern

Chondrozyten aus der Alginatkugel aus und adhären an der Oberfläche der Zellkulturflasche [153]. Sie bilden einen Monolayer aus, zunächst nur in der direkten Umgebung der Alginatkugel. Nach einigen Tagen erreichen sie Konfluenz. Die ausgewanderten (emigrierten) Zellen weisen einen runden bis ovalen Phänotyp auf, wie er typisch für Chondrozyten ist. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften eignet sich die Alginat-Kultur außerdem als Filterstation für die Isolierung einer reinen Chondrozytenpopulation. Es konnte gezeigt werden, dass es Fibroblasten oder fibroblastenähnlichen Zellen nicht möglich ist, in der Alginat-Kultur zu überleben [153,154]. Aus dem Alginat emigrierende Zellen stellen somit eine reine homogene Chondrozytenkultur, bestehend aus vitalen Zellen mit einem ähnlichen Differenzierungsniveau, dar. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass diese emigrierten Chondrozyten in der Lage sind knorpeltypische Markerproteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane, zu synthetisieren, wenn sie wieder in ein dreidimensionales Kultursystem überführt werden [25,78]. Ein weiterer Vorteil der Alginat-Kultur besteht in der Eigenschaft der emigrierten Chondrozyten zur weiteren Vermehrung in Monolayer-Kultur über einen längeren Zeitraum, sodass die Voraussetzung einer ausreichenden Zellzahl für die ACT erfüllt werden kann [21,158]. Die Alginat-Kultur bietet daher ein Reservoir, in dem Chondrozyten für Wochen vital und in differenziertem Zustand gehalten werden können [21,154]. Zum Anderen verfügen die aus dem Alginat emigrierten Chondrozyten über die Fähigkeit sich für längere Zeit in Monolayer-Kultur zu vermehren [20,21].

Die Proliferation der emigrierten Chondrozyten in Monolayer-Kultur unterliegt jedoch zeitlichen Grenzen. Die zur Vermehrung der Chondrozyten notwendigen Passagievorgänge sind nicht unbegrenzt durchführbar. Mit zunehmender Anzahl der Passagen verändern die Chondrozyten ihren chondrogenen Phänotyp. Bis Passage vier sind sie jedoch befähigt knorpeltypische Matrixproteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane, zu synthetisieren, wenn sie in ein dreidimensionales System überführt werden. Dieses Redifferenzierungspotential in der 3D-Kultur konnte ab Passage fünf nicht mehr gezeigt werden [25,78]. Stattdessen änderte sich das Syntheseprogramm der Chondrozyten und es wurde vermehrt aktivierte Caspase-3 (als Apoptose-Marker) nachgewiesen. Die Zellen wurden also apoptotisch [78]. Shakibaei et al., konnten 2006 jedoch das chondrogene Potential dedifferenzierender Chondrozyten durch Stimulation der Zellen mit IGF-I um weitere zwei Passagen bis zur sechsten Passage verlängern [77].

Um außerdem die Aussagekraft der Ergebnisse, die mit emigrierten Chondrozyten aus der Alginat-Kultur erzielt wurden zu überprüfen, wurden die gleichen Untersuchungen zum einen mit primären Chondrozyten (als Positivkontrolle) und zum anderen mit Fibroblasten (als

Negativkontrolle) durchgeführt. Es kam hierbei zu einer Übereinstimmung der Ergebnisse der mit emigrierten Chondrozyten durchgeführten Untersuchungen mit denen der primären Chondrozyten. Die Fibroblastenkulturen zeigten im Gegensatz dazu ein völlig zerstörtes Zellbild. Es konnte somit bestätigt werden, dass die Verwendung von emigrierten Chondrozyten aus der Alginat-Kultur eine optimale Zellpopulation für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen darstellt.

## **5.2. Wirkung von IL-1 $\beta$ auf Chondrozyten in Monolayer- und Massenkultur**

### **5.2.1. Dedifferenzierung, Degeneration und Apoptose**

Für die Pathogenese der Arthrose spielen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle. Die genauen Auslöser für die Zytokininduktion sind jedoch noch nicht genau geklärt. Mechanischer Stress, wie er bei Fehlbelastungen von Gelenken auftritt, stellt allerdings einen bekannten Stimulus für eine gesteigerte Produktion der Entzündungsmediatoren dar [44]. Weitere Faktoren, die störend in die Homöostase des Gelenkknorpels eingreifen, sind bestimmte Abbauprodukte der EZM, wie Fibronectinfragmente [51]. Die von Synoviozyten, Makrophagen und Chondrozyten sezernierten proinflammatorischen Zytokine bewirken im Gelenkknorpel eine Abnahme der Produktion knorpelspezifischer Matrixproteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane. Das Syntheseprogramm der Chondrozyten wird auf untypische Matrixkomponenten wie Kollagen Typ I, III und V und für Gelenkknorpel unspezifische Proteoglykane umgestellt [53,54]. Außerdem bewirken sie einen Anstieg in der Synthese weiterer proinflammatorischer Mediatoren und matrixabbauender Enzyme, wie COX-2 und MMPs [52] und hemmen die Synthese von MMP-Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases = TIMPs) [55], was zu einem zusätzlichen Abbau der EZM führt. Somit verändert sich die Zusammensetzung der EZM und die Chondrozyten weisen Dedifferenzierungsmerkmale auf.

In dieser Arbeit wurde die Stimulation der emigrierten Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  als Modell genutzt, um *in vitro* Veränderungen ähnlich der Arthrose nachzustellen. Um die starken katabolen Effekte von IL-1 $\beta$  auf die Chondrozyten nachzuweisen und somit auf die Notwendigkeit in dieses System einzugreifen aufmerksam zu machen, wurde mittels Elektronenmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie sowie auf molekularbiologischer Ebene mittels Westernblot Analysen und mit Immunfluoreszenz nach Veränderungen durch eine Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  über 72 Stunden gesucht.

Tatsächlich kam es bereits nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu ersten degenerativen Veränderungen. Diese zeigten sich morphologisch in einer Abrundung der Chondrozyten, geschwollenen Zellorganellen sowie einer Zunahme an Heterochromatin. Die degenerativen Prozesse verstärkten sich und führten zu einer kontinuierlichen Zunahme apoptotischer Veränderungen, die nach 72-stündiger Stimulation schließlich zu Chondrozyten mit fortgeschrittener Apoptose oder bereits lysierten Zellen führte. Die starken katabolen Effekte von IL-1 $\beta$  konnten auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Abnahme der knorpel-spezifischen Matrixkomponenten Kollagen Typ II und der Proteoglykane durch IL-1 $\beta$  konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden [52,149,159] und führte in dieser Arbeit nach 72-stündiger Stimulation zu einem drastischen Rückgang beider Matrixproteine.

Für die Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase spielt die Interaktion der Chondrozyten mit der EZM eine wesentliche Rolle. Vermittelt wird diese auch durch Signal- und Adhäsionsproteine (Integrine). Vor allem die  $\beta_1$ -Integrine spielen eine bedeutende Rolle im Gelenkknorpel. Hier konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einer deutlichen Herabregulierung von  $\beta_1$ -Integrin führte [62,77,160].

Besonders wichtig für die Aufrechterhaltung des chondrogenen Potentials der Zellen ist die Aufrechterhaltung wichtiger anaboler Signaltransduktionswege. Eine bedeutende Rolle im Zellwachstum und der Zelldifferenzierung kommt hierbei dem MAPKinase Signalweg zu [74]. In der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einer Abnahme der Expression von Erk 1/2, einem der wichtigsten Mediatoren dieses Signalweges, wobei die Isoform mit 42 kD (Erk 2) stärker betroffen war als die 44 kD Isoform. Erk 1/2 zeigen eine 90 %ige Sequenzidentität in Säugetieren. Erk 2 ist dabei generell stärker exprimiert. Daher lässt sich vermuten, dass die stärkere Expression von Erk 2 auch mit einer stärkeren Reaktion von Erk 2 auf die Stimulation mit IL-1 $\beta$  vergesellschaftet ist. Aktiviertes Erk 1/2 transloziert anschließend in den Zellkern, wo es die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert. Vor allem der chondrogene Transkriptionsfaktor Sox9 ist wesentlicher regulatorischer Faktor in der Differenzierung von Chondrozyten [77,79]. Shakibaei et al., konnten 2006 zum ersten Mal in Ko-Immunoprecipitationsversuchen eine direkte Assoziation von Erk 1/2 mit Sox9 nachweisen. Außerdem ist bereits bekannt, dass die katabolen Effekte von IL-1 $\beta$  über die Signalwege der MAPKinasen, Erk, p38 und JNK, vermittelt werden [82] sowie, dass im Gegensatz zu gesunden Chondrozyten, in Zellen von Arthrosepatienten geringere Mengen von Sox9 nachweisbar waren [161]. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit ein inhibitorischer Effekt von IL-1 $\beta$  auf die Expression von Sox9 nachgewiesen werden. Zu erklären ist dies zum einen durch eine direkte

hemmende Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die Sox9-Expression, zum anderen über eine verminderte Aktivierung durch die ebenfalls IL-1 $\beta$ -induzierte Herabregulierung der Erk 1/2-Expression.

Zusätzlich ergaben die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass die Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einer Steigerung der Synthese weiterer proinflammatorischer Enzyme und matrixdegenerierender Mediatoren, wie COX-2 und der MMPs führt. Tatsächlich sind katabole Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , wichtige Stimulatoren für die *de novo Synthese* kataboler Enzyme wie der MMPs, welche im Gelenkknorpel für den Abbau der EZM im Rahmen von arthrotischen Veränderungen verantwortlich gemacht werden [52]. Desweiteren wurde berichtet, dass Zytokine im Rahmen der Arthrose vor allem die Genexpression für MMP-13 verstärkten und die Hemmung dieses Signals zu vermindertem Knorpelabbau führte [162]. In gesundem Gelenkknorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen aktiven MMPs und ihren Inhibitoren (TIMPs), welches präzise geregelt wird. Im Unterschied dazu ist dieses Gleichgewicht bei arthrotischen Gelenkveränderungen gestört, was zu einem Überwiegen der MMPs und damit zu einem vermehrten Matrixabbau führt [163]. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte außerdem zu einer vermehrten Synthese von COX-2. Tatsächlich ist COX-2 ein wichtiger Mediator von Entzündungsprozessen und induziert die Gelenkzerstörung während der Arthrose [163].

Die somit stattfindenden Veränderungen der EZM, das heißt die Zerstörung und der Abbau der EZM, finden Bestätigung in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit.

Um ferner herauszufinden, wie sich die Stimulation der emigrierten Zellen mit IL-1 $\beta$  in Monolayer-Kultur auf die Zellen nach Transfer in ein dreidimensionales Kultursystem auswirkt, wurden die Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  in Massenkultur überführt und für weitere sieben Tage kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die bereits in Monolayer-Kultur stattgefundenen Dedifferenzierungsprozesse die Chondrozyten soweit geschädigt hatten, dass eine Redifferenzierung in einer 3D-Kultur nicht mehr möglich war. Morphologisch waren Apoptose und Zelllyse sichtbar. Die fehlende Matrixproduktion ließ sich außerdem auch auf molekularbiologischer Ebene nachweisen. Die Chondrozyten produzierten wenig oder gar keine knorpeltypischen Proteine, wie Kollagen Typ II,  $\beta_1$ -Integrin, die MAPKinase Mitglieder Erk 1/2 oder den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9. Im Gegensatz dazu konnten die apoptotischen Prozesse auch in einer gesteigerten Synthese von aktivierter Caspase-3 nachgewiesen werden. Die fehlende Matrixproduktion in IL-1 $\beta$ -stimulierten Chondrozyten lässt sich außerdem durch eine nachgewiesene verstärkte Expression von MMP-13 erklären.

### 5.3. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf mit IL-1 $\beta$ - behandelte Chondrozyten

#### 5.3.1. IGF-I

Aufgrund der aufgezeigten starken katabolen Effekte von IL-1 $\beta$  *in vivo* im Rahmen der Pathogenese der Arthrose und *in vitro* in der vorliegenden Arbeit, war es von außerordentlicher Wichtigkeit herauszufinden, wie die IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsprozesse in den Chondrozyten unterbrochen beziehungsweise gehemmt werden können. Wachstumsfaktoren spielen bekanntermaßen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase im gesunden Knorpel. Sie bestimmen Proliferation, Differenzierung und Dedifferenzierung der Chondrozyten [97]. Störungen im Gleichgewicht der Wachstumsfaktoren können Ursache für Knorpelerkrankungen sein. IGF-I ist einer der wichtigsten anabolen Wachstumsfaktoren in verschiedenen Geweben, so auch im Gelenkknorpel [108]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IGF-I in der Lage ist, die Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile im Knorpel dosisabhängig zu stimulieren [112] und es gleichzeitig einen inhibitorischen Effekt auf den Abbau von Proteoglykanen hat [113]. Außerdem spielt IGF-I eine wesentliche Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten-Vorläuferzellen und fördert die Chondrogenese [103,117]. Daher wurde IGF-I ausgewählt, um zu untersuchen, welche potentiell anabolen Effekte es auf IL-1 $\beta$ -induzierte Dedifferenzierungsvorgänge in den Chondrozyten besitzt.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IGF-I in der Lage ist, die IL-1 $\beta$ -induzierten morphologischen, degenerativen Veränderungen wie geschwollene Mitochondrien, erweitertes rER sowie die Apoptose aufzuheben. Außerdem wurde herausgefunden, dass IGF-I das chondrogene Potential IL-1 $\beta$ -behandelter dedifferenzierter Chondrozyten stimuliert, indem es den Phänotyp der Zellen stabilisiert, die Proliferation steigert und die Synthese knorpeltypischer Markerproteine sowie die Integrin-vermittelten Signalwege stimuliert. Die Stimulation des Integrin Signalweges führt weiterhin zur Aktivierung des Ras-MAPKinase Signalweges. So konnte gezeigt werden, dass IGF-I außerdem die IL-1 $\beta$ -induzierte Herabregulierung der MAPKinase Mitglieder Erk 1/2 und Sox9 hemmt.

Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen spielen eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben von Chondrozyten [62]. Vermittelt werden diese im Knorpelgewebe vor allem durch  $\beta_1$ -Integrine. Eine Störung dieser Interaktion zum Beispiel durch Antikörper in Massenkultur führte zu unumkehrbarer Dedifferenzierung und Apoptose der Chondrozyten [16]. Des weiteren ist bekannt, dass der IGF-I-Rezeptor in Chondrozyten mit  $\beta_1$ -Integrinen assoziiert ist und somit den MAPKinase Signalweg, als wichtige Kaskade für die Differenzierung der

Zellen, stimuliert [74]. Die Stimulation mit IGF-I könnte demnach nicht nur zu einer direkten Steigerung der Expression von  $\beta_1$ -Integrin, sondern zusätzlich zu einer verstärkten Aktivierung des MAPKinase Signalweges führen. Für den weiteren Verlauf der Signalkette konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung zentraler MAPKinase Mitglieder zu einer verstärkten Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 führt. Diese Stimulation scheint durch verschiedene Wachstumsfaktoren zusätzlich gefördert zu werden [77-79]. Desweiteren führte eine Blockierung der MAPKinase Signaltransduktion zur Apoptose von Chondrozyten und verminderte die Expression von Sox9 [62,79]. Sox9 als wichtiger chondrogener Transkriptionsfaktor reguliert die Differenzierung der Chondrozyten ebenso wie die Expression knorpelspezifischer anaboler Gene, wie für Kollagen Typ II und Aggrekan [164]. In arthrotischem Knorpelgewebe konnten jedoch, im Vergleich zu gesundem Gelenkknorpel, geringere Mengen an Sox9 nachgewiesen werden [161]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Behandlung mit Wachstumsfaktoren, wie hier mit IGF-I, das chondrogene Potential stabilisieren und zwar über den Integrin/MAPKinase Signalweg. Außerdem bestätigt es die Herabregulierung der Sox9-Expression durch IL-1 $\beta$  als wichtigen katabolen Faktor in der Entstehung der Arthrose. In der Tat wurde bereits beschrieben, dass die Expression und Aktivierung des Sox9-Gens durch Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , blockiert wird, vermutlich durch Hemmung des MAPKinase Signalweges vermittelt durch Wachstumsfaktoren [79].

Es konnte außerdem in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IGF-I der IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose und der Expression proinflammatorischer Enzyme und Mediatoren, wie MMP-13, MMP-9 und COX-2, entgegen wirkt. Das Ungleichgewicht in der Knorpelhomöostase bei Arthrose, verursacht durch einen Überhang katabolerer Mediatoren [163], wie IL-1 $\beta$ , wird demnach vermutlich durch die Behandlung mit IGF-I wieder ausgeglichen. Man kann daher vermuten, dass das Gleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Mediatoren, ähnlich dem Zustand im gesunden Gelenkknorpel, wiederhergestellt wird. Über diesen Weg könnte es auch zu einem Ausgleich der Expression von MMPs und ihren Inhibitoren, den TIMPs, kommen und zwar über eine Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten Synthese der MMPs.

Die genauen Wirkmechanismen von IGF-I sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren jedoch verschiedene Vermutungen über die anabolen Eigenschaften. Im Zusammenhang mit Arthrose konnten erhöhte Mengen von IGF-I in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden [129], vermutlich um den degenerativen Prozessen der Dedifferenzierung der Chondrozyten entgegenzuwirken. Allerdings scheint das Antwortverhalten der dedifferenzierten Zellen auf IGF-I vermindert zu sein [130]. Ursächlich spielt dabei vermutlich eine erhöhte Expression von

IGFBPs eine wichtige Rolle. Ihnen wird eine wichtige Funktion in der Regulation der Aktivität von IGF-I zugeschrieben. Vor allem IGFBP-3 wird eine hemmende Funktion nachgesagt, da es IGF-I in der EZM speichert und somit dessen Aktivität beeinträchtigen könnte [116]. Die genaue Funktion der IGFBPs ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und erscheint zum Teil kontrovers. So wirkt IGFBP-3 vermutlich auch aktivierend auf IGF-I, zum Beispiel wenn es *in vitro* mit den Zellen vorinkubiert wird [165]. Im Zusammenhang mit IGFBPs konnte außerdem gezeigt werden, dass verschiedene IGFBPs, ebenso wie Fibronectin, eine RGD-Domäne besitzen und somit an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin binden können [166]. Dies scheint ein weiterer Weg zu sein, die Effekte von IGF-I zu vermitteln. Für das verringerte Antwortverhalten dedifferenzierter Chondrozyten wird außerdem auch eine verringerte Anzahl oder Funktionalität des IGF-I-Rezeptors verantwortlich gemacht [130]. Die anabolen Wirkungen von IGF-I könnten auf der anderen Seite durch eine IGF-I-vermittelte Erhöhung der Anzahl metabolisch aktiver Zellen verstärkt werden [167]. Des Weiteren scheint IGF-I die adäquaten chondrogenen Signaltransduktionswege, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, in den Chondrozyten zu triggern und zu aktivieren.

### 5.3.2. TGF- $\beta$ 1

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Wachstumsfaktor ausgewählt, um dessen Wirkung auf die IL-1 $\beta$ -induzierten Veränderungen des Gelenkknorpels *in vitro* zu untersuchen. TGF- $\beta$  stellt einen in verschiedenen Geweben, besonders im Gelenkknorpel, vorkommenden, das Zellwachstum, die Differenzierung und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine beeinflussenden wichtigen Wachstumsfaktor dar [118]. Der Effekt von TGF- $\beta$  auf die Proliferation von Gelenkknorpelzellen wurde bereits vielfach untersucht, jedoch mit zum Teil kontroversen Ergebnissen was die verschiedenen Kulturmethoden betrifft. In den meisten Studien wird über eine Stimulation der Proliferation durch TGF- $\beta$  berichtet. Einen negativen Einfluss scheint allerdings die zeitliche Länge der bereits stattgefundenen Kultivierungsdauer sowie die Höhe der Passagievorgänge auf die Proliferationsfähigkeit der Chondrozyten zu haben [64]. Im Gelenkknorpel ist TGF- $\beta$  mit dem Latent TGF- $\beta$  Binding Protein (LTBP) assoziiert, welches den Transport von TGF- $\beta$  in die EZM und die damit verbundene Speicherung reguliert [102]. Vivien et al. beschreiben, dass TGF- $\beta$  die Proliferation und die Proteoglykansynthese der Chondrozyten anregen oder auch hemmen kann [168].

Es existieren drei Unterformen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3), welche alle zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehören. Bisher ist über wesentliche Unterschiede in den Wirkungen der

verschiedenen TGF- $\beta$ s nicht viel bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Unterformen im Rahmen von Arthrose vermehrt exprimiert werden, wobei TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in vergleichbaren und TGF- $\beta$ 3 unabhängig von den anderen beiden Unterformen in deutlich erhöhtem Maße synthetisiert wird [169]. Verschiedene Autoren konnten jedoch keine deutlichen Abweichungen zwischen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 auf die Proteoglykansynthese (Morales, 1994) und die Proliferation der Chondrozyten [107] feststellen. Tatsächlich weisen die drei TGF- $\beta$ -Unterformen einen hohen Grad an Homogenität von 84 bis 92 Prozent auf. Da in vorangegangenen Arbeiten zahlreiche Untersuchungen mit TGF- $\beta$ 1 unternommen wurden und es ein leicht zugängliches Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie darstellt, wurde es ausgewählt, um die potentiell anabolen Effekte von TGF- $\beta$  auf die IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsvorgänge in den Chondrozyten zu untersuchen.

Tatsächlich zeigt diese Arbeit, dass TGF- $\beta$ 1 in der Lage ist, die durch IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsvorgänge der Chondrozyten bis hin zur Apoptose zu verhindern, indem es eine rasche Regeneration der Zellen bereits nach wenigen Stunden bewirkt. Die Ko-Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führt, wie bereits mit IGF-I gezeigt, zur Aufrechterhaltung des chondrogenen Potentials bereits dedifferenzierter Chondrozyten. Dies konnte sowohl auf morphologischer als auch auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. TGF- $\beta$ 1 führt zu einer Stabilisierung des chondrogenen Phänotyps und stimuliert die Synthese matrixspezifischer Proteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane. Diese Beobachtung geht konform mit vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen [125]. In ein paar wenigen Studien wird allerdings auch über hemmende Effekte von TGF- $\beta$  auf die Proteoglykansynthese berichtet. Beispiel hierfür ist die invers regulierte Expression des kleinen Proteoglykans Dekorin, welches im Gegensatz zu den Hauptproteoglykanen Aggrekan oder Biglykan durch TGF- $\beta$  herabreguliert wird [170]. Eine mögliche Erklärung hierfür besteht in der Eigenschaft von Dekorin an TGF- $\beta$  zu binden und somit dessen biologische Eigenschaften zu hemmen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 die IL-1 $\beta$ -induzierte Abnahme der Integrin-Expression hemmt und gleichzeitig zu einem neuerlichen Anstieg von  $\beta$ 1-Integrin führt. Loeser berichtete in diesem Zusammenhang über unterschiedliche Effekte von TGF- $\beta$  auf die verschiedenen  $\beta$ 1-Integrine. Zum einen verursachte TGF- $\beta$  eine Abnahme der Expression von  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin auf der Zelloberfläche, zum anderen einen Anstieg von  $\alpha$ 3/ $\alpha$ 5  $\beta$ 1-Integrin. Die Behandlung mit TGF- $\beta$  resultierte in einer verminderten Bindung der Chondrozyten von Kollagen Typ IV, gleichzeitig wurde die Adhäsion an Kollagen Typ II gesteigert [171].

An der Signaltransduktion von TGF- $\beta$  sind, neben rezeptorassoziierten SMAD-Proteinen, welche nach Bildung eines Komplexes in den Zellkern translozieren und dort die Transkription wichtiger Proteine regulieren, verschiedene Mitglieder der MAPK Signalkaskade beteiligt. Über die TGF- $\beta$  activating kinase 1 (TAK1), einem Mitglied des MAPKinase Weges, werden beispielsweise verschiedene andere MAPKinasen, wie ERK, p38 und JNK, aktiviert. Des Weiteren existieren Verbindungen zwischen dem SMAD- und anderen TGF- $\beta$ -vermittelten Signalwegen [172]. Hier gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 anabole Effekte auf den MAPKinase Signalweg ausübt. Über die Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsvorgänge ist TGF- $\beta$ 1 in der Lage die Expression von Erk 1/2 zu stimulieren. Die Aktivierung von Erk 1/2 führt zu dessen Translokation in den Zellkern und hier zu einer Aktivierung des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9, welcher für die Regulierung wichtiger knorpelspezifischer Proteine verantwortlich ist. In einer Arbeit von 2006 konnten Shakibaei et al. die direkte Assoziation von Erk 1/2 und Sox9 demonstrieren [77]. Beobachtungen aus anderen Arbeiten bestätigen die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivierung der MAPKinase Wege [172].

Die anabole Wirkung von TGF- $\beta$ 1 beruht vor allem auf der Hemmung der IL-1 $\beta$ -vermittelten knorpeldestruierenden Effekte. Diese Arbeit zeigt, dass TGF- $\beta$ 1 in der Lage ist, der IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose und der Expression proinflammatorischer Enzyme und Mediatoren, wie MMP-13, MMP-9 und COX-2, entgegenzuwirken. Etwa 38 Prozent der Gene, die durch IL-1 $\beta$  reguliert werden, erfahren eine Hemmung durch TGF- $\beta$  [173]. Tatsächlich betrifft dies unter anderem die matrixabbauenden Matrix Metalloproteinasen, wie MMP-13 und -9. Auf diese Weise kann der Abbau wichtiger extrazellulärer Matrixproteine verhindert werden. Desweiteren wirkt TGF- $\beta$  der verminderten Synthese von Kollagen Typ II und anderen extrazellulären Matrixbestandteilen entgegen [173]. Der somit verhinderte Matrixabbau wird zusätzlich durch eine TGF- $\beta$ -induzierte vermehrte Synthese von TIMPs gehemmt. Die schützende Rolle von TGF- $\beta$  gegen Zytokin-induzierten Knorpel- beziehungsweise Kollagenabbau konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden [174]. Die Fähigkeit von TGF- $\beta$  das Knorpelgewebe vor den Schäden durch IL-1 $\beta$  zu schützen ist jedoch nur in begrenztem Maße möglich. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass es nach IL-1-Exposition zu einer reduzierten Hemmwirkung durch TGF- $\beta$  kommt. Dies lässt vermuten, dass es im Rahmen von arthrotischen Knorpelveränderungen zu einem verminderten Antwortverhalten der Chondrozyten auf anabole Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, kommt und somit die Homöostase nicht aufrecht erhalten werden kann. Ursächlich hierfür wird eine Abnahme der Rezeptoren für TGF- $\beta$  und die damit

verbundene herabgesetzte Wirkung von TGF- $\beta$  gegen die Effekte von IL-1 $\beta$  diskutiert. Außerdem könnte die Herabregulierung wichtiger Mediatoren der TGF-Signalwege, wie SMADs, oder eine verstärkte Expression hemmender SMADs eine wichtige Rolle spielen [128]. Im Vergleich zu IGF-I scheint TGF- $\beta$  stärker auf die Proliferation und Differenzierung, im Sinne einer stärker induzierten Expression von Aggrecan-mRNA, zu wirken [124]. Auch in anderen Arbeiten wird von einer effektiveren Wirkung von TGF- $\beta$ , im Vergleich zu IGF-I, gesprochen [175]. Es lässt sich somit vermuten, dass TGF- $\beta$  eine spezifische Rolle in der Aufrechterhaltung von zellulärem Wachstum und Differenzierung hat.

### 5.3.3. Die kombinierte Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1

Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass IGF-I und TGF- $\beta$  die Proliferation und Differenzierung von periostalen Mesenchymzellen während der Chondrogenese synergistisch regulieren [103]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl für IGF-I als auch für TGF- $\beta$ 1 wichtige Funktionen in der Regulation, der Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten nachgewiesen werden. Beide Wachstumsfaktoren kommen in großen Mengen in der EZM vor und werden dort in Komplexen mit Bindungsproteinen gespeichert. Sowohl IGF-I als auch TGF- $\beta$ 1 führen separat zu einer Aufrechterhaltung des knorpeltypischen Phänotyps und des chondrogenen Potentials, indem sie den IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsvorgängen entgegenwirken. Aufgrund der aufgezeigten starken anabolen Wirkungen von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Gelenkchondrozyten in Monolayer-Kultur im Einzelnen wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, einen potentiellen Synergismus von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellen zu zeigen.

Tatsächlich wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie IGF-I und OP-1, in synergistischer Weise Einfluss auf die Knorpelzellen nehmen können [98]. Für IGF-I und TGF- $\beta$  gibt es ebenfalls bereits Hinweise auf einen Synergismus [103,124]. Belege hierfür liegen bisher jedoch nicht in ausreichendem Maße vor. Ebenso sind die genauen Mechanismen über die Wirkungsweise beider Faktoren nicht geklärt. Es kann jedoch vermutet werden, dass die Regulation der Wachstumsfaktoren über spezifische Bindungsproteine oder gemeinsame Signalkaskaden für die synergistischen oder additiven Wirkungen von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 eine wichtige Rolle spielen. Genaue Erkenntnisse, in welcher Weise die Wachstumsfaktoren hierbei eine synergistische Wirkung ausüben, spielen

eine wichtige Rolle für das Verständnis über den Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung sowie für eine potentielle therapeutische Anwendung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1.

Auch im Rahmen dieser Arbeit bewirkten IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in der Kombinationsbehandlung eine deutliche Verdichtung des Zellbilds in der Monolayer-Kultur. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 additive Effekte auf die  $\beta$ 1-Integrin-Expression ausübt. Es scheint jedoch, als würden hohe Konzentrationen beider Wachstumsfaktoren zu einer Art „steady state“ führen. Man kann vermuten, dass ab einem gewissen Punkt ein Fließgleichgewicht erreicht wird, bei dem es den Chondrozyten nicht mehr möglich ist, auf die Stimulation hoher Konzentrationen an Wachstumsfaktoren mit entsprechend gesteigerter Proteinexpression zu reagieren. Es lässt sich spekulieren, ob eine verminderte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren oder gar toxische Effekte der Wachstumsfaktoren für diese Beobachtung eine Rolle spielen.

Synergistische Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$  konnten ebenfalls auf die Induktion von wichtigen extrazellulärer Matrixproteine, wie der mRNA von Aggrecan und Kollagen Typ II, bei dedifferenzierten humanen Gelenkchondrozyten nachgewiesen werden [125]. Der IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierung der Chondrozyten konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch eine Kombinationsbehandlung mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 entgegengewirkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit beiden Wachstumsfaktoren additive Effekte auf die Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane aufweist. Chondrozyten, die aus mesenchymalen Stammzellen gewonnen werden und mit IGF und TGF behandelt werden, waren in der Lage chondrogene Markerproteine, wie Kollagen Typ II, Proteoglykane und Sox9, ähnlich primären Chondrozyten, zu produzieren [176]. Da die EZM eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung des chondrogenen Phänotyps spielt, stellt diese Beobachtung eine zentrale Funktion der Wachstumsfaktoren dar.

Wichtig für die Aufrechterhaltung des chondrogenen Potentials ist außerdem die Stimulation anaboler Signaltransduktionswege. Das Adaptorprotein Shc spielt eine wichtige Rolle als intrazellulärer Signalvermittler und steht am Anfang verschiedener Signalkaskaden, unter anderem auch des MAPKinase Signalübertragungsweges. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, wie oben beschrieben, die Assoziation von  $\beta$ 1-Integrinen mit dem IGF-I-Rezeptor, welche und zu einer Aktivierung des MAPKinase Signalübertragungsweges führt und weitere wichtige Mitglieder dieses Signalweges aktiviert [74]. Die Signaltransduktion von TGF- $\beta$ -induzierten Effekten scheint verschiedene Wege, vor allem die Aktivierung von SMADs aber auch den MAPKinase Signalweg zu nutzen. In der Arbeit von 2006 konnten Longobardi et al. zeigen, dass

die proliferativen Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 über den MEK1/2-Erk1/2 Signalweg vermittelt werden [176]. Eine Blockade dieser Kaskade verminderte allerdings die Effektivität der beiden Wachstumsfaktoren. Vermutlich spielen andere Signalwege von IGF-I und TGF- $\beta$ , die nicht gemeinsam über die Aktivierung der MAPKinasen laufen, eine wichtige Rolle für diese Beobachtung.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich ein additiver Effekt von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Expression wichtiger chondrogener Signalmediatoren, wie Shc und Erk1/2. Schließlich führt die Translokation von Erk1/2 in den Zellkern zu einer Aktivierung des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9, welcher die Aktivität wichtiger knorpelspezifischer Markerproteine reguliert und somit für eine Aufrechterhaltung des chondrogenen Potential sorgt [79]. Für die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 konnten in dieser Arbeit additive Effekte auf die Expression von Sox9 gezeigt werden. Besonders hohe Konzentrationen der beiden Wachstumsfaktoren führten jedoch zur Erreichung eines Fließgleichgewichtes, bei dem die Expression von Sox9 nicht weiter gesteigert werden konnte. Man kann vermuten, dass die Expression von Proteinen nicht unbegrenzt gesteigert werden kann, eventuell durch potentiell toxische Effekte von Wachstumsfaktoren in höheren Dosen oder durch Erschöpfung der intrazellulären Proteinbiosynthese.

IGF-I und TGF- $\beta$ 1, einzeln oder in Kombination, besitzen antiinflammatorische Eigenschaften, um den durch katabole Zytokine induzierten Matrixabbau zu verhindern. Sie sind in der Lage den IL-1 $\beta$ -induzierten Dedifferenzierungsvorgängen entgegenzuwirken und hemmen die Expression von Entzündungsmediatoren, wie MMP-9 und MMP-13 und COX-2 sowie von Caspase-3. Scheinbar weisen beide Wachstumsfaktoren gegenläufige Effekte auf die Apoptose der Chondrozyten auf. So scheint der TGF- $\beta$ -induzierte Anstieg von IGFBP-3 das Zellwachstum zu hemmen, da es freies IGF bindet [118].

Der Ursache für die deutlich additiven Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 liegen mehrere Vermutungen zugrunde. Eine Erklärung für die anabole Wirkung der Wachstumsfaktoren scheint die Erhöhung der Anzahl metabolisch aktiver Zellen zu sein [98]. Außerdem aktivieren und triggern einzelne Wachstumsfaktoren Signaltransduktionswege in Chondrozyten, wobei Kombinationen von Wachstumsfaktoren Signalwege aktivieren können, die nicht durch einzelne Faktoren beeinflusst werden und wo additive Effekte auf die Zelldifferenzierung und das Überleben der Zellen beobachtet werden können [124,125]. Es ist ferner bekannt, dass TGF- $\beta$  in der Lage ist die Expression von IGF-I-Rezeptoren zu fördern (Tsukazaki et al., 1994). Eine weitere Vermutung über die Ursachen des beobachteten additiven Effekts der

Wachstumsfaktoren stellt ein erhöhtes Antwortverhalten von IGF-I durch Stimulation mit TGF- $\beta$  dar. Tatsächlich konnten Tsukazaki et al. eine Zunahme der IGF-I-Rezeptordichte nach einer Vorstimulation mit TGF- $\beta$  nachweisen [124].

Auf der anderen Seite gibt es zum Teil widersprüchliche Ansätze über die Wirkungen der beiden Faktoren aufeinander. So scheint der TGF-Signalweg zwar wichtig für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) zu sein, ein synergistischer Einfluss auf die Wirkung von IGF auf die MSCs (Pelletgröße, Proliferation und Differenzierung) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [176].

Scheinbar besitzt TGF- $\beta$  die Fähigkeit die Expression von IGFBPs zu regulieren [124](Martin und Baxter; 1991; Mondschein et al., 1990). Obwohl IGFBPs zum Teil gegensätzliche Funktionen in der Regulation von IGF-I übernehmen, könnte die Regulation durch TGF- $\beta$  eine mögliche Erklärung für die additive Wirkung beider Wachstumsfaktoren sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination von Wachstumsfaktoren zu einer Hemmung der Zytokin-induzierten Dedifferenzierungsprozesse und einer Verstärkung der MAPKinase Signalwege führt. Es kommt weiterhin zu einer Aktivierung des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 und damit zu einer Stabilisierung der Differenzierung der Chondrozyten. Diese Beobachtungen könnten eine wichtige Möglichkeit darstellen, Wachstumsfaktoren in das Repertoire chondroprotektiver Agenzien aufzunehmen, um die bisherigen Therapieoptionen mit nicht steroidalen Antirheumatika und anderen antiinflammatorischen Medikamenten zu erweitern und zu verbessern.

#### **5.4. Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Chondrozyten während der Chondrogenese (Chondrozyten in Massenkultur)**

##### **5.4.1. IGF-I**

Die Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Monolayer-Kultur stellt eines der größten Probleme für die Therapieoptionen von Knorpeldefekten dar. Dedifferenzierte Chondrozyten sind nicht in der Lage solche Defekte effektiv und dauerhaft zu füllen. Im Gegensatz zur Monolayer-Kultur bietet die 3D-Kultur bessere Wachstums- und Differenzierungsoptionen für Chondrozyten. Durch die Unterstützung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen kann in diesem Modell die chondrogene Differenzierung gefördert werden [177]. Aus diesem Grund wird diese dreidimensionale Kultur gern genutzt um die biologischen Eigenschaften der Zellen zu untersuchen sowie die Chondrogenese *in vitro* nachzustellen. Die Massenkultur bietet den Chondrozyten die Möglichkeit in einer dreidimensionalen Kultur ähnlich den *in vivo*

Bedingungen zu wachsen und ihren chondrogenen Phänotyp wiederzuerlangen und diesen aufrechtzuerhalten. Von zentralem Interesse im Rahmen dieser Arbeit war es daher die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf das Redifferenzierungspotential von Chondrozyten in einem dreidimensionalen Kulturmodell zu untersuchen.

Aufgrund der Erkenntnisse aus der Monolayer-Kultur sollte das Potential dedifferenzierter Chondrozyten aus der Monolayer-Kultur zur Bildung einer extrazellulären Matrix in Massenkultur untersucht werden. Die emigrierten Chondrozyten wurden daher in Monolayer-Kultur einzeln oder mit beiden Wachstumsfaktoren in Kombination ko-stimuliert. Die so stimulierten Chondrozyten wurden dann im Anschluss für weitere sieben Tage in Massenkultur kultiviert.

Während der Chondrogenese kommt es zunächst zu einer Rekrutierung und Migration mesenchymaler Vorläuferzellen. Diese verdichten sich schließlich zu einem Aggregat. Hierbei kommt es zu intensivierten Zell-Zell-Kontakten [178]. Eine weitere wichtige Rolle in der Vermittlung der Zell-Matrix-Kontakte spielen die Integrine. Untersuchungen von Shakibaei et al. zeigten eine deutlich unterschiedliche Verteilung der Integrine während der Chondrogenese. Demnach ist  $\alpha_1$ -Integrin zu Beginn der Chondrogenese *in vitro* nachweisbar und verteilt sich im Verlauf immer mehr in die perichondrale Region und kann auf der Oberfläche von fibroblastenähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu scheint  $\alpha_3$ -Integrin im Zentrum des sich ausbildenden Knorpelknötchens nachweisbar [15]. Die undifferenzierten Mesenchymzellen produzieren große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen Typ I, Hyaluron, Tenaskin und Fibronektin [179]. Der Kondensationsphase schließt sich die Differenzierung der Mesenchymzellen zu Chondroblasten an. Es kommt zur gesteigerten Expression knorpelspezifischer Gene, wie des Transkriptionsfaktors Sox9. Dadurch wird die Proteinsynthese von Kollagen Typ I auf die Synthese der knorpeltypischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrekan umgestellt. Die Chondrozyten sind nun umhüllt von ihrer EZM und haben eine charakteristische runde Morphologie ausgebildet. Zellen, die sich im Zentrum dieses Knorpelgebildes befinden, differenzieren weiter und entwickeln sich zu hypertrophen Chondrozyten, die durch ein großes Zellvolumen und die Expression spezieller Markergene, wie Kollagen Typ X, gekennzeichnet sind [180].

Es gibt eine Reihe von Wachstumsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie die Chondrogenese, die Proliferation von Chondrozyten und die hypertrophe Differenzierung regulieren. Zu ihnen zählen unter anderem IGF, TGF- $\beta$ , BMPs und FGFs [178]. Martin et al. haben beispielsweise die Erfahrung gemacht, dass mit FGF-2 behandelte Chondrozyten in der Lage waren ihr

chondrogene Potential in einer dreidimensionalen Kultur aufrechtzuerhalten [141]. Von IGF-I ist im Allgemeinen bekannt, dass es sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Synthese von Matrixproteoglykanen und Kollagen Typ II steigert [109]. Die Wirkung auf die mitotische Aktivität von Gelenkchondrozyten ist weniger stark ausgeprägt [181]. Außerdem spielt IGF-I eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der EZM, auch in Kombination mit TGF- $\beta$  [182].

In der Tat konnten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wirkungen von IGF-I zeigen, dass morphologisch dedifferenzierte Chondrozyten aus Monolayer-Kultur fähig waren nach einem Transfer in eine dreidimensionale Kultur zu vitalen Chondrozyten zu redifferenzieren. Diese redifferenzierten Zellen zeichnen sich durch die Produktion einer umfassenden Menge an extrazellulärer Matrix aus. Die knorpelspezifischen Matrixproteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane, konnten in stark erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden.

Wichtige Signalwege, die Schritte während der Chondrogenese kontrollieren, umfassen die Proteinkinase C (PKC) und die MAPKinasen. Die Aktivierung des MAPKinasen Signalweges wird durch Integrine vermittelt [74]. Die Wirkungen von IGF-I werden durch die Interaktion mit dem IGF-I-Rezeptor vermittelt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung unterschiedlicher MAPKinasen und der Phosphatidylinositol-3-kinase Akt. Tatsächlich führte die Stimulation mit IGF-I zu einer deutlichen Steigerung der Expression von Shc, welches zu Beginn der MAPKinasen Signalkette steht, sowie von Erk1/2. Nachdem Erk1/2 in den Zellkern transloziert, aktiviert es dort den wichtigsten chondrogenen Marker, Sox9. Dieser am Ende der MAPKinasen Signalkette stehende chondrogene Transkriptionsfaktor konnte in deutlich gesteigerter Expression nach Stimulation mit IGF-I in der Massenkultur in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Oh et al. beschrieben 2003 eine gesteigerte Phosphorylierung von p38 während der Chondrogenese von Hühnerknorpel-Vorläuferzellen, wohingegen die Erk-Phosphorylierung abnahm. Außerdem führte die Hemmung der MEK/Erk-Aktivität zu einer verstärkten Chondrogenese [183]. Dies scheint kontrovers im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Andere Untersuchungen, wie von Murakami et al., ergaben eine vermehrte Induktion des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9, vermittelt über eine Aktivierung von MEK/Erk nach Stimulation mit FGF [79]. Vermutlich liegen dieser Diskrepanz unterschiedliche Versuchsansätze mit unterschiedlichem Knorpelausgangsmaterial und verschiedenen Kulturbedingungen zugrunde.

Einen weiteren wichtigen Faktor für eine erfolgreiche Chondrogenese stellt außerdem die Hemmung von katabolen Entzündungsmediatoren und knorpeldegenerierender Mediatoren, wie sie durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  vermehrt exprimiert werden, dar. Es konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass IGF-I zu einer deutlich verminderten

Expression von MMP-13 führte. Die Synthese des Apoptosemarkers Caspase-3 wurde ebenfalls durch die Behandlung mit IGF-I deutlich gesenkt und war kaum mehr nachweisbar.

#### 5.4.2. TGF- $\beta$ 1

Von zentralem Interesse war es außerdem die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf das Redifferenzierungspotential von Chondrozyten in einem dreidimensionalen Kulturmodell zu untersuchen. Bekanntermaßen spielt TGF- $\beta$  eine essentielle Rolle im Verlauf der Chondrogenese. Die mRNA der drei Unterformen TGF- $\beta$ 1 bis - $\beta$ 3 werden während der verschiedenen Phasen, einschließlich der Kondensationsphase, exprimiert [184]. TGF- $\beta$  vermittelt seine Signale im Allgemeinen durch die Bindung an den TGF- $\beta$ -Rezeptor II. Diese Interaktion führt im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung der SMAD-Signalkette. Mittlerweile ist bekannt, dass neben den SMADs auch andere Signaltransduktionswege wichtige Wege zur Vermittlung der Effekte von TGF- $\beta$  darstellen. Dazu gehören auch die MAPKinase-Signale [172]. Wichtig für die Chondrogenese ist vor allem die Steigerung der Synthese einer großen Zahl von Molekülen, die mit der prächondrogenen Kondensation assoziiert sind, wie zum Beispiel Tenascin, Fibronectin, N-CAM und N-Cadherin. An dieser Regulierung sind sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch - $\beta$ 3 beteiligt. Daher wird vermutet, dass alle drei Unterformen von TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle in der Erstellung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen während der frühen Kondensationsphase spielen.

Die bisherigen Erfahrungen mit TGF- $\beta$  und dessen Wirkung auf die Stimulation der Chondrogenese beruhen überwiegend auf Untersuchung mit mesenchymalen Vorläuferzellen. Johnstone et al. konnten beispielweise stimulatorische Effekte auf die Chondrogenese von MSCs aus dem Knochenmark nachweisen [185]. In welcher Weise TGF- $\beta$  an der Bildung eines dreidimensionalen Knorpelkonstrukts aus differenzierten Chondrozyten beteiligt ist, stellte den Gegenstand der vorliegenden Arbeit dar.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit TGF- $\beta$ 1 in der Monolayer-Kultur erweckten das Interesse diese Effekte auf das chondrogene Potential dedifferenzierter Chondrozyten aus der Monolayer-Kultur in einem dreidimensionalen Kulturmodell zu untersuchen. Die emigrierten Chondrozyten wurden daher in Monolayer-Kultur mit TGF- $\beta$ 1 ko-stimuliert. Die so stimulierten Chondrozyten wurden dann im Anschluss für weitere sieben Tage in Massenkultur kultiviert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die anabole Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Redifferenzierungskapazität der Chondrozyten aus Monolayer-Kultur nach dem Transfer in eine dreidimensionale Kultur deutlich dar. Nach sieben Tagen in Massenkultur lässt sich durch die

Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 ein typisches dreidimensionales Zell-Matrix-Konstrukt nachweisen. Die redifferenzierten Chondrozyten dieses Konstrukts mit einem typischen runden bis ovalen Phänotyp sind umgeben von einer umfassenden Menge an extrazellulärer Matrix. Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Syntheseleistung von typischen Markern der Chondrogenese, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane, ist hierbei deutlicher als der von IGF-I. Es lässt sich vermuten, dass die stärkere Wirkung von TGF- $\beta$ 1 mit den Kulturbedingungen zusammenhängt. Blumenfeld et al. konnten zeigen, dass die Zelldichte beachtlichen Einfluss auf die TGF- $\beta$ -Wirkung ausübt. Nur in Massenkulturen zeigte sich eine gesteigerte der Proteoglykan-Synthese (verglichen mit niedrigeren Zelldichten) [186].

Auch die Synthese der die Zell-Matrix-Interaktionen vermittelnden  $\beta$ 1-Integrine ist verglichen mit IGF-I gesteigert. Da Integrine eine zentrale Rolle während der Chondrogenese auch im Sinne von Signalproteinen einnehmen, liegt nahe, dass der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Chondrogenese höher ist als der von IGF-I. Da neben der Aktivierung des SMAD-Weges Signale auch über Mitglieder der MAPKinase weitergeleitet werden, wurden Untersuchungen angestellt, um die Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 auf der Signalebene zu untersuchen. Zu Beginn vieler Signalketten steht bekanntermaßen häufig Shc. TGF- $\beta$ 1 hat sowohl auf die Expression von Shc als auch auf Erk 1/2 einen noch stärkeren stimulatorischen Effekt als IGF-I. Dass sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch IGF-I einen ähnlichen Effekt auf die Synthese beider Signalproteine aufweisen scheint nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass eine Assoziation zwischen Shc und Erk 1/2 in Chondrozyten besteht [78]. Der chondrogene Transkriptionsfaktor Sox9 spielt neben den Integrinen die wichtigste Rolle für eine erfolgreiche Chondrogenese [79]. Er ist somit deutlicher Marker dafür, dass TGF- $\beta$ 1 eine bedeutende stimulatorische Funktion auf die Chondrogenese ausübt. Tatsächlich zeigte sich, dass die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 in den redifferenzierten Chondrozyten die Synthese von Sox9 steigert, und das ebenfalls in höherem Maße als IGF-I. Wichtig für die Knorpelentwicklung ist aber nicht nur die Stimulation zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren sondern auch die Hemmung von proinflammatorischen und katabolen Mediatoren, welche zu einem Abbau von EZM und zur Dedifferenzierung von Chondrozyten führt. TGF- $\beta$ 1 stellt sich hierbei als besonders effektiv heraus. Die hemmende Wirkung auf den Apoptosemarker Caspase-3 und auf MMP-13 verbessert die Bedingungen für die Chondrogenese.

Man kann verschiedene Vermutungen über die Ursachen der stärkeren Wirkung von TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu IGF-I auf die Chondrogenese anstellen. Zum einen ist bekannt, dass IGF-I eher die die Synthese der EZM *in vivo* und *in vitro* steigert [109]. Zum anderen ist die Wirkung von IGF-

I auf die mitotische Aktivität von Gelenkchondrozyten und damit die Proliferation weniger stark ausgeprägt [181]. Auf der anderen Seite demonstrierten Worster et al. 2002, dass die Vorbehandlung von mesenchymalen Stammzellen mit TGF- $\beta$ 1 gefolgt von einer zusätzlichen Applikation mit IGF-I zu einer gesteigerten Synthese von Markerproteinen der Chondrogenese, Proteoglykane und Prokollagen II, führt. Die alleinige Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einem deutlich geringeren Effekt auf die Chondrogenese. Die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 ist hierbei dosisabhängig [187]. Auch Miura et al., 1994 untersuchten den Effekt von TGF- $\beta$  auf die Chondrogenese und demonstrierten die dosisabhängige Wirkung. Die Reparatur von Teildefekten *in vivo* wird durch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen aus der Synovia angetrieben und durch TGF- $\beta$ 1 stimuliert [133]. Außerdem konnte tatsächlich gezeigt werden, dass exogen zugeführtes TGF- $\beta$ 1 die endogene Expression von TGF- $\beta$ 1 und dessen Rezeptor hochreguliert [155].

#### 5.4.3. Die kombinierte Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in Massenkultur

Die Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 und IGF-I im Einzelnen waren so deutlich, dass in einem weiteren Versuchsansatz herausgefunden werden sollte, ob die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren einen additiven Effekt auf die Knorpelentwicklung hat. Es existieren bereits ein paar wenige Hinweise auf synergistische Aktivitäten von Wachstumsfaktoren auf Knorpelgewebe. Ein solcher Effekt wurde für die Kombination von FGF-2 und BMP-2 beschrieben. Die kombinierten Wachstumsfaktoren förderten die Redifferenzierung von bereits dedifferenzierten Chondrozyten in Massenkulturen [141,177]. Desweiteren konnte bereits eine Stimulation der Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 nachgewiesen werden [124].

Für IGF-I und TGF- $\beta$  existieren bisher Untersuchungen mit Mesenchymzellen. Beide Wachstumsfaktoren scheinen die Proliferation und Differenzierung von periostalen Mesenchymzellen während der Chondrogenese additiv zu regulieren. Hierbei wird eine frühe Induktion der Chondrogenese durch TGF- $\beta$  sowie eine Verstärkung durch IGF-I und damit eine Aufrechterhaltung der Zellproliferation beschrieben [103]. IGF-I in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 verstärkte das gesamte Knorpelwachstum. Einen besonderen Proliferationsstimulus erfuhren die periostalen Mesenchymzellen vor allem in der frühen Phase der Chondrogenese [103].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der kombinierten Behandlung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das chondrogene Potential von Chondrozyten in der Massenkultur untersucht. Die Ergebnisse belegen deutlich, dass die Kombination beider Wachstumsfaktoren einen additiven

Effekt auf die Chondrogenese hat. Wichtige Markerproteine werden durch die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in höherem Maße exprimiert als durch die Behandlung mit nur einem dieser beiden. Dies betrifft vor allem die Expression der knorpeltypischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Proteoglykane. In einer Arbeit von Sakimura et al. 2006 führte die Kombination beider Wachstumsfaktoren zu deutlich höheren Mengen von Glykosaminoglykanen als die alleinige Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 [182]. In Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zu einer gesteigerten Expression von Markerproteinen der Chondrogenese, wie Kollagen Typ II, Sox9 und Proteoglykane, führte. Hierbei schien die Wirkung von IGF-I auf die Proliferation und Differenzierung unabhängig von TGF- $\beta$  zu sein [176]. Die Arbeitsgruppe kam außerdem zu dem Ergebnis, dass TGF- $\beta$ 1 seine Wirkung über den MEK 1/2-Erk 1/2 Signalweg vermittelt, welcher ebenfalls an der Vermittlung der IGF-I Wirkung beteiligt ist. Dies geht konform mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 stimuliert wichtige Mitglieder des MAPKinase Signalweges in weitaus höherem Maße als IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 allein. Sowohl das Signal- und Adhäsionsprotein  $\beta$ 1-Integrin als auch das zu Beginn vieler Signalwege stehende Shc werden deutlich stärker exprimiert als nach alleiniger Stimulation mit nur einem der beiden Wachstumsfaktoren. Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion kommt es zu einer Aktivierung des zentralen Mitglieds dieser Kette, Erk 1/2. Auch hier kann ein additiven Effekt von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 beobachtet werden. Longobardi et al. 2006 führen außerdem auf, dass eine Unterbrechung der MEK 1/2-Erk 1/2 Signalkette nicht zu einer Minderung der chondrogenen Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 führt, jedoch zu einem kleinen Abfall der Expression von Kollagen Typ II. Dies scheint widersprüchlich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu sein. Es liegt allerdings die Vermutung nahe, dass mehrere Signalwege an der Wirkung der Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Auch für die Kombination von TGF- $\beta$ 3 mit BMP-6 oder TGF- $\beta$ 3 mit IGF-I konnte ein deutlicher induktiver Effekt auf die Chondrogenese gezeigt werden. Hierbei war vor allem die Expression von Sox9 und die der extrazellulären Matrixgene gesteigert [188]. Als wichtiger chondrogener Marker konnte auch für Sox9 in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass beide Wachstumsfaktoren einen additiven Effekt auf dessen Expression haben und damit auch auf die Chondrogenese.

Um zu belegen, dass emigrierte Chondrozyten aus der Alginat-Kultur fähig sind in einer dreidimensionalen Kultur zu redifferenzieren und Knorpel zu bilden, wurden alle Untersuchungen auch mit primären Chondrozyten und mit Fibroblasten durchgeführt. Im Gegensatz zu primären Chondrozyten und emigrierten Chondrozyten aus Alginat-Kulturen waren Fibroblasten nicht in

der Lage in der Massenkultur zu redifferenzieren. Diese Zellen erlitten Zelltod und produzierten keine knorpelspezifischen Marker, weder in Gegenwart von Wachstumsfaktoren noch ohne diese. Die detaillierten Mechanismen, in welcher Weise Wachstumsfaktoren auf die Chondrogenese Einfluss nehmen sind nicht genau geklärt. Es gibt allerdings einige Erklärungsversuche für diese positiven Wirkungen. Zum einen besitzen Wachstumsfaktoren proliferative Eigenschaften [176]. Einzelne Faktoren aktivieren und triggern verschiedene Signaltransduktionswege. Die Kombination könnte allerdings dazu führen, dass Signalwege in Chondrozyten aktiviert werden, die nicht durch einen Wachstumsfaktor allein stimuliert werden. Auf diese Weise könnte es zu einem synergistischen oder additiven Effekt auf die Differenzierung der Zellen und ihr Überleben kommen [189].

### **5.5. Mögliche Anwendung der mit Wachstumsfaktoren gewonnenen Zellen für Tissue Engineering**

Seit einigen Jahren wird die autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) im Rahmen des Tissue Engineering als der „Goldstandard“ in der Therapie von Defekten des Gelenkknorpels bezeichnet [135]. Trotz der bisherigen guten Ergebnisse existieren wenige Erfahrungen in der Langzeittherapie mit autologen Chondrozyten [139]. Zudem zeigen sich einige Schwachstellen in Zusammenhang mit der herkömmlichen Methode. Eines der größten Probleme stellen Dedifferenzierungsprozesse dar, denen die transplantierten Chondrozyten zum Teil unterliegen. Darunter leidet schließlich die Qualität des Transplantats. Um überhaupt eine ausreichende Anzahl transplantierbarer Chondrozyten zu erhalten, ist die Proliferation der Zellen in der Zellkultur nötig. Dies ist bisher in umfangreichem Ausmaß nur in der Monolayer-Kultur möglich. Hierbei sind zur effizienten Vermehrung der Chondrozyten Passagierprozesse nötig. Im Verlauf dieser kommt es zur phänotypischen Dedifferenzierung der Zellen. Sie nehmen eine fibroblastenähnliche Gestalt an. Mit zunehmender Passagezahl ändert sich auch das Syntheseprogramm der Zellen. Die Synthese knorpeltypischer Marker wird umgestellt auf untypische Proteine, wie Kollagen Typ I anstelle von Kollagen Typ II [37]. Im weiteren Verlauf in der Monolayer-Kultur kommt es zu einer Abnahme der Proliferation und damit auch des chondrogenen Potentials [141]. Die im Rahmen dieses Kultur-Modells entstehende Zellpopulation ist demnach nicht fähig Knorpeldefekte suffizient und langfristig zu decken. Außerdem können sich diese Dedifferenzierungsvorgänge auch nach der Transplantation noch fortsetzen [138].

Bisher existieren einige wenige Ansätze um diese Probleme zu beseitigen oder zu mindern. Dazu gehört die Möglichkeit, passagierte Chondrozyten aus der Monolayer-Kultur in einem dreidimensionalen Kultursystem redifferenzieren zu lassen. Das Redifferenzierungsvermögen der Chondrozyten ist allerdings auf einige Passagen begrenzt [25]. Aus Untersuchungen, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, geht hervor, dass Wachstumsfaktoren in der Lage sind dieses chondrogene Potential der Zellen aufrechtzuerhalten. Durch die Behandlung mit IGF-I konnte die Redifferenzierungskapazität der Chondrozyten *in vitro* um zwei Passagen (bis Passage sechs) verlängert werden. Durch Bindung an seinen Rezeptor aktiviert IGF-I die Signalkette der MAPKinase. Es kommt zu einer Aktivierung von Erk 1/2, welches in Assoziation mit dem chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 steht. Auf diese Weise ist IGF-I in der Lage das chondrogene Potential der Zellen während der *in vitro* Phase zu stabilisieren und zu verlängern [77]. In der vorliegenden Arbeit konnten für TGF- $\beta$ 1 ähnliche Ergebnisse erzielt werden. In der dreidimensionalen Kultur zeigte TGF- $\beta$ 1 sogar deutlich stärkere Effekte auf das Redifferenzierungsvermögen der Chondrozyten als IGF-I. In der Monolayer-Kultur bereits phänotypisch dedifferenzierte Chondrozyten sind demnach durch die Behandlung mit Wachstumsfaktoren in der Lage nach Überführung in die Massenkultur zu redifferenzieren und knorpeltypische Eigenschaften wiederzuerlangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe von Wachstumsfaktoren die Möglichkeit besteht, *in vitro* dedifferenzierende autologe Chondrozyten mit höherer Erfolgsrate zu redifferenzieren. Somit ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche ACT, nämlich die ausreichende Anzahl differenzierter Chondrozyten, erfüllt. Außerdem konnte deutlich gezeigt werden, dass die Behandlung mit Wachstumsfaktoren eine Stabilisierung des differenzierten Phänotyps der Chondrozyten ermöglicht. Bei allen Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, wurde die additive Wirkung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das chondrogene Potential der Chondrozyten auffällig. Langfristig könnten die erlangten Ergebnisse also zur Verbesserung der Chondrozytenkultivierung in Hinblick auf Arthrosetherapie und ACT genutzt werden. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren beschränkt sich jedoch bisher auf die Behandlung kleinerer traumatisch entstandener Knorpeldefekte. Das große Potential der Wachstumsfaktoren auf das chondrogene Potential der Chondrozyten für die ACT obliegt daher weiteren Untersuchungen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der Zunahme von Gelenkknorpelschäden in der heutigen Gesellschaft und der damit verbundenen Gefahr der Arthrosebildung besteht die dringende Indikation zur therapeutischen Intervention. Die bisherige Therapie beschränkt sich allerdings weitgehend auf den Einsatz antiphlogistischer und schmerzlindernder Medikamente oder in fortgeschrittenen Stadien der Arthrose die chirurgische Intervention bis zum Einsatz der totalen Endoprothese. Im Rahmen der modernen gelenktherapeutischen Forschung, steht seit einigen Jahren eine neue vielversprechende Methode zur Verfügung. Die autologe Knorpeltransplantation (ACT) gilt als der „Goldstandard“ in der Therapie von Knorpeldefekten. Aus einem gesunden Knorpelareal werden Proben entnommen, die Chondrozyten isoliert und anschließend *in vitro* vermehrt. Ist eine ausreichende Zellzahl vorhanden, werden die Chondrozyten in den bestehenden Knorpeldefekt transplantiert und mit einem Periostlappen gedeckt. Die ACT weist jedoch einige Beschränkungen und Probleme auf. Trotz der bisher guten Ergebnisse [139] ist die Anwendung auf kleinere, oberflächliche Knorpeldefekte beschränkt. Problematisch ist außerdem die Dedifferenzierung der Chondrozyten während der Proliferationsphase in der Monolayer-Kultur *in vitro* [78]. Diese dedifferenzierten Zellen sind nicht fähig, den Knorpeldefekt suffizient und lang anhaltend zu füllen.

Ziel dieser Arbeit war es daher nach Möglichkeiten zur Gewinnung von vitalem Knorpelmaterial zu suchen, damit dieses im Rahmen der ACT erfolgreich verwendet werden kann. Von Wachstumsfaktoren ist beispielsweise bekannt, dass sie anabole Wirkungen auf das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Chondrozyten aufweisen [103,190]. Aus diesem Grund wurden die Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das chondrogene Potential und somit auf das Redifferenzierungsverhalten der Chondrozyten *in vitro* untersucht. Hierfür wurden die beiden Wachstumsfaktoren zum einen einzeln sowie in Kombination miteinander verwendet. Außerdem wurde zusätzlich zu den Untersuchungen in der Monolayer-Kultur der Einfluss von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf das Redifferenzierungspotential der Zellen in einem dreidimensionalen Kultursystem untersucht.

Eine im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichte Untersuchung konnte zeigen, dass das chondrogene Potential der Chondrozyten durch die Behandlung mit IGF-I verlängert werden kann [77]. Normalerweise dedifferenzieren Chondrozyten in der Monolayer-Kultur nach mehreren Passagievorgängen und verlieren somit ihre knorpeltypischen Eigenschaften. Durch die

Behandlung mit IGF-I kann dieses Dedifferenzierungsverhalten bis zur sechsten/siebten Passage hinausgezögert und somit das chondrogene Potential der Zellen aufrechterhalten werden.

Um in dieser Arbeit knorpeldegenerierende Prozesse nachzustellen, wurden die Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Als proinflammatorisches Protein spielt IL-1 $\beta$  bekanntermaßen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arthrose [41]. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 in dieser Arbeit konnten auf morphologischer Seite zeigen, dass sowohl IGF-I als auch TGF- $\beta$ 1 in der Lage waren den chondrogenen Phänotyp der Zellen aufrechtzuerhalten. Mit Wachstumsfaktoren behandelte Zellen wiesen die knorpeltypische ovale oder langgestreckte Form auf. Die Zellorganellen waren gut ausgeprägt und im Zentrum zeigte sich ein großer Zellkern, welcher reichlich Euchromatin enthielt. Diese Effekte fanden Bestätigung in molekularbiologischen Untersuchungen. Die Synthese wichtiger knorpelspezifischer Proteine, wie Kollagen Typ II und Proteoglykane, konnte durch die Behandlung mit IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 stimuliert werden. Auch die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 wurde gesteigert. Im Gegensatz dazu erfuhren Entzündungsmediatoren wie Matrix-Metalloproteinasen oder COX-2 eine deutliche Herabregulierung. Besonders effektiv war die Verwendung der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren. Hierbei ergaben sich additive Effekte auf die Expression wichtiger knorpelspezifischer Proteine wie Kollagen Typ II, Proteoglykane,  $\beta$ 1-Integrin, Erk 1/2 und Sox9. Weiterhin konnten Apoptose induzierende Prozesse besonders effektiv durch die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1, demonstriert durch die behinderte Expression von Caspase-3, gehemmt werden.

Um bessere *in vivo* Verhältnisse nachzustellen, wurden die Untersuchungen auch auf die dreidimensionelle Ebene erweitert. Stimulierte Chondrozyten wurden im Anschluss an die Monolayer-Kultur für sieben Tage in Massenkultur kultiviert. Hier zeigte sich, dass Zellen, die mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden, nicht fähig waren zu redifferenzieren. Ganz im Gegensatz zu Chondrozyten nach der Behandlung mit Wachstumsfaktoren. IGF-I-behandelte Zellen redifferenzierten umgehend innerhalb der sieben Tage in Massenkultur und zeigten sowohl morphologisch als auch auf Proteinebene knorpeltypische Eigenschaften. Noch effektiver als IGF-I zeigte sich hierbei TGF- $\beta$ 1. Das Redifferenzierungspotential der Chondrozyten war jedoch am deutlichsten zu beobachten nach der Behandlung mit der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren. Der additive Effekt beider Wachstumsfaktoren ließ sich demnach am eindrucksvollsten im dreidimensionalen System demonstrieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen, dass Wachstumsfaktoren, vor allem in Kombination die Zytokin induzierten proinflammatorischen

degradierenden Enzyme und Mediatoren hemmen und die MAPKinase Signalwege, vor allem den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 stimulieren. Auf diesem Weg sind sie fähig die Differenzierung der Chondrozyten zu stabilisieren. Diese bedeutenden *in vitro* Effekte von kombinierten Wachstumsfaktoren sind wichtige Erkenntnisse im Rahmen von Untersuchungen chondroprotektiver Substanzen. Über diesen Weg können Wachstumsfaktoren klinische Anwendung als anti-rheumatische und anti-inflammatorische Medikamente finden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S: Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001;S26-33.
2. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477-486.
3. Martinek V, Ueblacker P, Imhoff AB: Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:782-788.
4. Meredith D, Bell P, McClure B, Wilkins R: Functional and molecular characterisation of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:227-234.
5. Urban JP: The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1994;33:901-908.
6. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ: Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:564-572.
7. Kuettner KE: Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992;25:155-163.
8. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E, Wu W: Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii78-81.
9. Lohmander S: Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol* 1988;2:37-62.
10. Yanagishita M: Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:283-293.
11. Ruoslahti E, Yamaguchi Y: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867-869.
12. Poole AR, Webber C, Pidoux I, Choi H, Rosenberg LC: Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. *J Histochem Cytochem* 1986;34:619-625.
13. Schwartz NB, Dorfman A: Stimulation of chondroitin sulfate proteoglycan production by chondrocytes in monolayer. *Connect Tissue Res* 1975;3:115-122.
14. Loeser RF, Carlson CS, McGee MP: Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* 1995;217:248-257.
15. Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ: Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 1995;43:1061-1069.
16. Shakibaei M: Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 1998;240:95-106.
17. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB: TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* 1993;158:414-429.
18. Hunziker EB, Wagner J, Zapf J: Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994;93:1078-1086.
19. Dingle JT: The mechanisms of cartilage catabolism. *Agents Actions Suppl* 1986;18:31-37.
20. Bruckner P, Horler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, Spycher MA: Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J Cell Biol* 1989;109:2537-2545.

21. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ: Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 1):17-27.
22. Petit B, Masuda K, D'Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, Morris NP, Uebelhart D, Schmid TM, Thonar EJ: Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Exp Cell Res* 1996;225:151-161.
23. Liu H, Lee YW, Dean MF: Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:505-515.
24. Shakibaei M, Schroter-Kermani C, Merker HJ: Matrix changes during long-term cultivation of cartilage (organoid or high-density cultures). *Histol Histopathol* 1993;8:463-470.
25. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M: Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002;308:371-379.
26. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986;46:271-282.
27. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
28. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA: Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 2001;294:339-345.
29. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA: Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:485-516.
30. Otey CA, Pavalko FM, Burridge K: An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 1990;111:721-729.
31. Lin CQ, Bissell MJ: Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb J* 1993;7:737-743.
32. Lafrenie RM, Yamada KM: Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem* 1996;61:543-553.
33. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239.
34. Volberg T, Romer L, Zamir E, Geiger B: pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001;114:2279-2289.
35. Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D: Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1993;205:276-285.
36. Knudson W, Loeser RF: CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:36-44.
37. Shakibaei M, De Souza P, Merker HJ: Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int* 1997;21:115-125.
38. Shakibaei M, Merker HJ: Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res* 1999;296:565-573.
39. Shakibaei M, Abou-Rebyeh H, Merker HJ: Integrins in ageing cartilage tissue in vitro. *Histol Histopathol* 1993;8:715-723.
40. Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony HP: [Cytokines.]. *Z Rheumatol* 2007;66:297-303.

41. Goldring MB: Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:459-465.
42. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum* 1999;42:710-718.
43. Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A: Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983;49:309-316.
44. Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Fink C, Guilak F: Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:792-798.
45. Kronheim SR, Mumma A, Greenstreet T, Glackin PJ, Van Ness K, March CJ, Black RA: Purification of interleukin-1 beta converting enzyme, the protease that cleaves the interleukin-1 beta precursor. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:698-703.
46. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP: The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992;35:530-540.
47. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385:729-733.
48. Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, Martel-Pelletier J: Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol* 1997;24:1985-1994.
49. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D: Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992;175:323-329.
50. Goldring MB: The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999;40:1-11.
51. Homandberg GA, Kang Y, Zhang J, Cole AA, Williams JM: A single injection of fibronectin fragments into rabbit knee joints enhances catabolism in the articular cartilage followed by reparative responses but also induces systemic effects in the non-injected knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:673-683.
52. Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F, Goldring MB: Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2000;43:2189-2201.
53. Sandell LJ, Aigner T: Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3:107-113.
54. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM: Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 1988;82:2026-2037.
55. Agarwal S, Long P, Gassner R, Piesco NP, Buckley MJ: Cyclic tensile strain suppresses catabolic effects of interleukin-1beta in fibrochondrocytes from the temporomandibular joint. *Arthritis Rheum* 2001;44:608-617.

56. Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, Shum L, Slavkin HC: Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 14):2067-2076.
57. Shlopov BV, Gumanovskaya ML, Hasty KA: Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:195-205.
58. Gunther M, Haubeck HD, van de Leur E, Blaser J, Bender S, Gutgemann I, Fischer DC, Tschesche H, Greiling H, Heinrich PC, et al.: Transforming growth factor beta 1 regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1994;37:395-405.
59. Sakai T, Kambe F, Mitsuyama H, Ishiguro N, Kurokouchi K, Takigawa M, Iwata H, Seo H: Tumor necrosis factor alpha induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCS-2/8 cells through activation of NF-kappaB: abrogation of the tumor necrosis factor alpha effect by proteasome inhibitors. *J Bone Miner Res* 2001;16:1272-1280.
60. Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM: 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* 2002;46:2079-2086.
61. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM: Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;256:27-33.
62. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ: Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 2001;276:13289-13294.
63. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K: Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:389-391.
64. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146:75-85.
65. Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M: Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997;40:1749-1755.
66. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Jr., Lotz MK: Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:712-719.
67. Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW, Wang F, Keller PM, DeWolf WE, Jr., Goldring MB, Badger AM, Lee D, Levy MA, Gowen M, Lark MW: Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 2000;18:356-363.
68. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M: Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 2008;75:677-687.
69. Kuhn K, Hashimoto S, Lotz M: IL-1 beta protects human chondrocytes from CD95-induced apoptosis. *J Immunol* 2000;164:2233-2239.
70. Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, Bristow C, Roy S, Nicholson DW, Baldwin AS, Jr.: NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 2003;278:2963-2968.
71. Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ: Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003;48:700-708.

72. Jabs T: Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 1999;57:231-245.
73. Ravichandran KS: Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 2001;20:6322-6330.
74. Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ: Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 1999;342 Pt 3:615-623.
75. Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T: Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* 1998;18:2571-2585.
76. Shaw PE, Saxton J: Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1210-1226.
77. Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmanzadeh M, Mobasheri A: Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1382-1395.
78. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, de Souza P, John T, Shakibaei M: Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:448-458.
79. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B: Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1113-1118.
80. Wong M, Carter DR: Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003;33:1-13.
81. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al.: Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;372:525-530.
82. Scherle PA, Pratta MA, Feeser WS, Tancula EJ, Arner EC: The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:573-577.
83. Saklatvala J: Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr Drug Targets* 2007;8:305-313.
84. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612-1615.
85. Shah GM, Shah RG, Poirier GG: Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:838-844.
86. Okada Y: Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:33-42.
87. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
88. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP: Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076.
89. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K: Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:639-652.

90. Baker AH, Edwards DR, Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727.
91. Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grenman R, Fusenig NE, Lopez-Otin C, Kahari VM: Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 2:227-235.
92. Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 2004;14:197-204.
93. Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Squires G, Kojima T, Wu W, Billingham RC: Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp* 2003:115-123.
94. Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE: Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done? *Arthritis Rheum* 1994;37:1115-1126.
95. Lindahl A, Nilsson A, Isaksson OG: Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of rabbit epiphyseal chondrocytes at different stages of maturation. *J Endocrinol* 1987;115:263-271.
96. Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB: Transient chondrocyte nonresponsiveness to insulin-like growth factor-1 upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure is not related to IGF receptor damage. *J Rheumatol* 1991;18:585-590.
97. Mandl EW, Jahr H, Koevoet JL, van Leeuwen JP, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ: Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture. *Matrix Biol* 2004;23:231-241.
98. Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S: The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003;48:2188-2196.
99. Biddulph DM, Capehart AA, Beasley TC: Comparative effects of cytosine arabinoside and a prostaglandin E<sub>2</sub> antagonist, AH6809, on chondrogenesis in serum-free cultures of chick limb mesenchyme. *Exp Cell Res* 1991;196:131-133.
100. Loveridge N, Dean V, Goltzman D, Hendy GN: Bioactivity of parathyroid hormone and parathyroid hormone-like peptide: agonist and antagonist activities of amino-terminal fragments as assessed by the cytochemical bioassay and in situ biochemistry. *Endocrinology* 1991;128:1938-1946.
101. Katoh R, Urist MR: Surface adhesion and attachment factors in bone morphogenetic protein-induced chondrogenesis in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 1993:295-304.
102. van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB: Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:631-637.
103. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW: Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:55-64.
104. Trippel SB: Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995;43:129-132.
105. Kato Y, Hiraki Y, Inoue H, Kinoshita M, Yutani Y, Suzuki F: Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur J Biochem* 1983;129:685-690.
106. Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ: Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* 1989;7:35-42.

107. Guerne PA, Sublet A, Lotz M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994;158:476-484.
108. Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL: Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J Endocrinol* 1995;146:279-286.
109. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ: Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:276-288.
110. Benito M, Valverde AM, Lorenzo M: IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:499-510.
111. Verschure PJ, Marle JV, Joosten LA, Helsen MM, Lafeber FP, Berg WB: Localization of insulin-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan synthesis and content. *Br J Rheumatol* 1996;35:1044-1055.
112. Coutts RD, Sah RL, Amiel D: Effects of growth factors on cartilage repair. *Instr Course Lect* 1997;46:487-494.
113. Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE: Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* 2003;32:70-76.
114. Czech MP: Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 1989;59:235-238.
115. Morales TI: The role and content of endogenous insulin-like growth factor-binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1997;343:164-172.
116. Martin JA, Buckwalter JA: The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 2000;37:129-140.
117. Maor G, Hochberg Z, Silbermann M: Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;128:56-64.
118. Schuster N, Kriegelstein K: Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002;307:1-14.
119. Villiger PM, Lotz M: Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. *J Cell Physiol* 1992;151:318-325.
120. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J: TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992;71:1003-1014.
121. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P: Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:6954-6967.
122. Shioda T, Lechleider RJ, Dunwoodie SL, Li H, Yahata T, de Caestecker MP, Fenner MH, Roberts AB, Isselbacher KJ: Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9785-9790.
123. de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ: Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998;12:1587-1592.
124. Tsukazaki T, Usa T, Matsumoto T, Enomoto H, Ohtsuru A, Namba H, Iwasaki K, Yamashita S: Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 1994;215:9-16.
125. Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM: Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 1997;237:318-325.

126. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr.: Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989;84:678-685.
127. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB: In vivo protection against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann Rheum Dis* 1994;53:593-600.
128. Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1338-1347.
129. Dore S, Aribat T, Rousseau N, Brazeau P, Tardif G, DiBattista JA, Cloutier JM, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: Increased insulin-like growth factor 1 production by human osteoarthritic chondrocytes is not dependent on growth hormone action. *Arthritis Rheum* 1995;38:413-419.
130. Dore S, Pelletier JP, DiBattista JA, Tardif G, Brazeau P, Martel-Pelletier J: Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum* 1994;37:253-263.
131. Hunziker EB, Driesang IM, Morris EA: Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Clin Orthop Relat Res* 2001:S171-181.
132. Mankin HJ: The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:460-466.
133. Hunziker EB, Rosenberg LC: Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:721-733.
134. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND: The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:1232-1251.
135. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-895.
136. Bentley G, Greer RB, 3rd: Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971;230:385-388.
137. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L: Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res* 2001:S337-348.
138. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S147-155.
139. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A: Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000:212-234.
140. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Thornemo M, Faber B, Tarkowski A, Peterson L, Lindahl A: Clonal growth of human articular cartilage and the functional role of the periosteum in chondrogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:146-153.
141. Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE: 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* 1999;253:681-688.
142. Ma PX, Langer R: Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage. *J Biomed Mater Res* 1999;44:217-221.

143. Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR: Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999;58:130-135.
144. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G: Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res* 2000;50:101-109.
145. van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB, Homminga GN: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 1995;66:549-556.
146. Nerem RM: Cellular engineering. *Ann Biomed Eng* 1991;19:529-545.
147. Rosselot G, Reginato AM, Leach RM: Development of a serum-free system to study the effect of growth hormone and insulinlike growth factor-I on cultured postembryonic growth plate chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992;28A:235-244.
148. Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, Zardi L, Culp LA: Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for a cryptic glycosaminoglycan-binding domain. *J Cell Biol* 1987;105:1443-1454.
149. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP: Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 2000;68:144-149.
150. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001;44:585-594.
151. Hunziker EB: Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:22-32.
152. Oakes BW: Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust* 2004;180:S35-38.
153. Shakibaei M, Csaki C, Rahmanzadeh M, Putz R: [Interaction between human chondrocytes and extracellular matrix in vitro: a contribution to autologous chondrocyte transplantation]. *Orthopade* 2008;37:440-447.
154. Shakibaei M, De Souza P: Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 1997;21:75-86.
155. Mizuta H, Sanyal A, Fukumoto T, Fitzsimmons JS, Matsui N, Bolander ME, Oursler MJ, O'Driscoll SW: The spatiotemporal expression of TGF-beta1 and its receptors during periosteal chondrogenesis in vitro. *J Orthop Res* 2002;20:562-574.
156. Benya PD, Shaffer JD: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215-224.
157. Norby DP, Malemud CJ, Sokoloff L: Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture. *Arthritis Rheum* 1977;20:709-716.
158. Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK: Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989;19:277-297.
159. Sabatini M, Rolland G, Leonce S, Thomas M, Lesur C, Perez V, de Nanteuil G, Bonnet J: Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix metalloproteinase expression in rabbit articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:438-444.
160. Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasher A: 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* 2007;73:1434-1445.

161. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, Bau B, Harley V, Poschl E: SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2003;22:363-372.
162. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M: Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003;288:208-217.
163. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, Meats JE, Russell RG: Stimulation by human interleukin 1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1984;797:186-193.
164. Buckwalter JA, Brown TD: Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004:7-16.
165. De Mellow JS, Baxter RC: Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:199-204.
166. Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W: An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 2006;281:14085-14091.
167. Loeser RF, Shakoor N: Aging or osteoarthritis: which is the problem? *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:653-673.
168. Vivien D, Redini F, Galera P, Lebrun E, Loyau G, Pujol JP: Rabbit articular chondrocytes (RAC) express distinct transforming growth factor-beta receptor phenotypes as a function of cell cycle phases. *Exp Cell Res* 1993;205:165-170.
169. Pombo-Suarez M, Castano-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A: Differential up-regulation of the three TGF- $\beta$  isoforms in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis* 2008.
170. Demoor-Fossard M, Galera P, Santra M, Iozzo RV, Pujol JP, Redini F: A composite element binding the vitamin D receptor and the retinoic X receptor alpha mediates the transforming growth factor-beta inhibition of decorin gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2001;276:36983-36992.
171. Loeser RF: Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum* 1997;40:270-276.
172. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577-584.
173. Takahashi N, Rieneck K, van der Kraan PM, van Beuningen HM, Vitters EL, Bendtzen K, van den Berg WB: Elucidation of IL-1/TGF-beta interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:426-438.
174. Hui W, Rowan AD, Cawston T: Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha. *Cytokine* 2001;16:31-35.
175. Burton-Wurster N, Lust G: Fibronectin and proteoglycan synthesis in long term cultures of cartilage explants in Ham's F12 supplemented with insulin and calcium: effects of the addition of TGF-beta. *Arch Biochem Biophys* 1990;283:27-33.
176. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL, Spagnoli A: Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow

- mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res* 2006;21:626-636.
177. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS: Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 1999;64:67-76.
  178. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS: Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:309-334.
  179. Kulyk WM, Upholt WB, Kosher RA: Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development* 1989;106:449-455.
  180. Reichenberger E, Aigner T, von der Mark K, Stoss H, Bertling W: In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Biol* 1991;148:562-572.
  181. Trippel SB, Corvol MT, Dumontier MF, Rappaport R, Hung HH, Mankin HJ: Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res* 1989;25:76-82.
  182. Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, Osaki M, Shindo H: Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold. *Cells Tissues Organs* 2006;183:55-61.
  183. Oh CD, Chun JS: Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 2003;278:36563-36571.
  184. Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI: Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 1991;115:1091-1105.
  185. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-272.
  186. Blumenfeld I, Gaspar R, Laufer D, Livne E: Enhancement of toluidine blue staining by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor and growth hormone in the temporomandibular joint of aged mice. *Cells Tissues Organs* 2000;167:121-129.
  187. Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ: Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 2001;19:738-749.
  188. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A: Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:914-919.
  189. Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, Van Wijnen AJ, Sun Y, Loeser RF: Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J Biol Chem* 2003;278:25386-25394.
  190. Loeser RF, Shanker G: Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro. *Arthritis Rheum* 2000;43:1552-1559.

## 8. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei nicht nur für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas sondern vor allem für die außerordentlich intensive Betreuung, die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen sowie die stetige Geduld, die er mir entgegengebracht hat, bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Shakibaei in München, vor allem bei Frau Dr. med. vet. Constanze Csaki und Frau Karoline Fischer, für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre enorme Hilfsbereitschaft sowohl in der Theorie als auch in der Praxis.

Der Arbeitsgruppe Haisch, vor allem Herrn Privatdozent Dr. med. Andreas Haisch und Frau Dipl. ing. Ulrike Marzahn, gilt mein besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in ihre Räumlichkeiten und die Unterstützung bei der Fortführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern am Institut für Pharmakologie und Toxikologie nicht nur für die stetige Hilfestellung sondern auch für die nette Arbeitsatmosphäre.

Ich danke außerdem Herrn Benjamin Kohl dafür, dass er mir mit viel Geduld eine außerordentliche Unterstützung bei der Lösung von Problemen war.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre stetige Geduld, Motivation und Unterstützung bedanken.

## 9. LEBENS LAUF

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



## 10. ANHANG

### **Publikationen**

(Original-Paper)

Shakibaei M, **Seifarth C**, John T, Rahmanzadeh M, Mobasheri A.  
Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: Molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol.* 2006;72 (11):1382-95

Shakibaei M, John T, **Seifarth C**, Mobasheri A.  
Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1095:554-63.

**Seifarth C**, Csaki C, Shakibaei M.  
Anabolic actions of IGF-I and TGF- $\beta$ 1 on IL-1 $\beta$ -treated human articular chondrocytes: Evaluation in two and three dimensional cultures. *Histology and Histopathology.* 2009; in press

### **Poster**

(Abstracts)

John T, Kohl B, **Seifarth C**, Mobasheri A, Shakibaei M.  
Effects of IL-18 on human articular chondrocytes *in vitro*.  
22. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2005

Shakibaei M, John T, **Seifarth C**, Mobasheri A.  
Resveratrol Inhibits IL-1 $\beta$ -Induced Stimulation of Caspase 3 and Cleavage of PARP in Human Articular Chondrocytes *in vitro*. Signal transduction pathways as therapeutic targets, Luxembourg 2006

**Seifarth C**, Mobasheri A, Ellinghaus A, John T, Wolff C, Shakibaei M.  
IGF-1-induced stability of chondrogenic potential in human articular chondrocytes *in vitro*.  
101. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg 2006

**Seifarth C**, Mobasheri A, Csaki C, Shakibaei M.

IGF-I and TGF-beta exert common anabolic effects on articular chondrocytes *in vitro*.

24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2007

**Vorträge**

**Seifarth C**, Mobasheri A, Shakibaei M.

IGF-I and TGF- $\beta$  exert common anabolic effects on articular chondrocytes *in vitro*.

102. Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, Giessen 2007

## 11. ERKLÄRUNG

„Ich, Claudia Seifarth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Wachstumsfaktor-induzierte Stabilisierung des chondrogenen Potentials der humanen Chondrozyten *in vitro*: Mögliche Anwendung für das Tissue-Engineering) selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift