

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Geschäftsf. Direktor: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner

**Einfluß von Faktoren in  
Synovialflüssigkeiten von Arthrosepatienten  
auf die Spätdifferenzierung von  
Knorpelzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Verena Nieländer

geb. Hered

aus Marl

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Pap

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie  
Geschäftsf. Direktor: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner  
Referent: Univ.-Prof. Dr. phil. Peter Bruckner  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Pap

## **Zusammenfassung**

# **Einfluß von Faktoren in Synovialflüssigkeiten von Arthrosepatienten auf die Spätdifferenzierung von Knorpelzellen**

Verena Nieländer

Die Chondrocyten-Spätdifferenzierung ist ein Prozess, der unter physiologischen Bedingungen während der enchondralen Ossifikation im Ersatzknorpel auftritt und sowohl für die Bildung als auch für das Längenwachstum der Röhrenknochen entscheidend ist. Unter pathologischen Bedingungen können Knorpel-differenzierungsvorgänge auch in permanentem Gelenkknorpel vorkommen. Markerproteine für den differenzierten Zellzustand wurden in Gelenkknorpel bei der Bildung einer Arthrose, einer der häufigsten Erkrankungen im Alter, die zur Degeneration des Gelenkknorpels führen, nachgewiesen (Kirsch et al., 2000; Pullig et al., 2000; Von der Mark et al., 1992). Diese Spätdifferenzierungsvorgänge können sehr gut am Modell des embryonalen Hühnersternums untersucht werden.

Die Arbeitshypothese war, daß bestimmte Faktoren, z.B. anabole Signalmediatoren oder Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteasen in Synovialflüssigkeiten von Arthrosepatienten unangemessene Chondrocyten-Spätdifferenzierungsvorgänge einleiten, die letztendlich zum Gelenkknorpelverlust führen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden:

1. Die Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten kann eine Hypertrophie von kranialen Chondrocyten einleiten. In den Zellkulturen konnten in Anwesenheit von Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten die



Markerproteine für den hypertrophen Zellzustand alkalische Phosphatase und Kollagen X nachgewiesen werden.

2. Die Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten kann bei kaudalen Chondrocyten eine Proliferation, jedoch keine vollständige Hypertrophie bewirken. In Kulturen kaudaler Zellen konnte zwar eine erhöhte alkalische Phosphataseaktivität detektiert werden, aber die Kollagen-X-Expression blieb aus. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Hypertrophiekompetenz der kranialen Chondrocyten des Hühnersternums stärker ausgeprägt ist, als die der Zellen des kaudalen Teils, was auch schon in früheren Arbeiten festgestellt wurde.
3. Die in dieser vorliegenden Arbeit zugeführten Protease-Inhibitoren konnten die Hypertrophie der kranialen Chondrocyten bei gleichzeitiger Kultivierung mit Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten nicht verhindern, so daß davon auszugehen ist, daß die in der Synovialflüssigkeit vorkommenden Proteasen eher eine untergeordnete Rolle bei der Einleitung von Differenzierungsvorgängen in Knorpelzellen spielen.
4. In einigen der untersuchten Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten fand sich eine deutlich erhöhte Konzentration von T4 im Vergleich zur Synovialflüssigkeit von Traumapatienten und im Vergleich zur Konzentration im humanen Serum. Der anabole Faktor Thyroxin könnte für die Einleitung von Spätdifferenzierungsvorgängen in vitro aber auch in arthrotischen Gelenkknorpelzellen in vivo verantwortlich sein und letztendlich die Knorpeldegeneration bei Arthrose einleiten.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2008

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Knorpel</b>	<b>10</b>
<b>1.1.1 Knorpelarten</b>	<b>10</b>
1.1.1.1 Hyaliner Knorpel	11
1.1.1.2 Elastischer Knorpel	11
1.1.1.3 Faserknorpel	12
<b>1.1.2 Extrazelluläre Matrix</b>	<b>14</b>
1.1.2.1 Glykane	14
1.1.2.1.1 Hyaluronsäure	14
1.1.2.1.2 Proteoglykane	14
1.1.2.2 Kollagene	15
1.1.2.2.1 Typ-I-Kollagen	16
1.1.2.2.2 Typ-II-Kollagen	16
1.1.2.2.3 Typ-X-Kollagen	17
1.1.2.2.4 Typ-IX-Kollagen	18
1.1.2.2.5 Typ-XI-Kollagen	18
<b>1.2 Knochenentwicklung</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1 Desmale Ossifikation (<i>Osteogenesis membranacea</i>)</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2 Chondrale Ossifikation (<i>Osteogenesis cartilaginea</i>)</b>	<b>20</b>
1.2.2.1 Perichondrale Ossifikation	20
1.2.2.2 Enchondrale Ossifikation	20
1.2.2.2.1 Reservezone ( <i>Zona reservata cartilaginis</i> )	21
1.2.2.2.2 Proliferationszone ( <i>Zona proliferativa</i> )	21
1.2.2.2.3 Resorptionszone ( <i>Zona resorbens cartilaginea</i> )	22
1.2.2.2.4 Verknöcherungszone ( <i>Zona ossificationis</i> )	22
<b>1.3 Einfluß löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spätendifferenzierung</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1 Thyroidhormone (<i>Thyroxin, Trijodthyronin</i>)</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2 Insulin-like growth factor I (<i>IGF-I</i>)</b>	<b>24</b>
<b>1.3.3 Proteasen und Protease-Inhibitoren</b>	<b>24</b>
1.3.3.1 Chymotrypsin	24
1.3.3.2 o-Phenanthrolin und EDTA	25
1.3.3.3 Sonstige Protease-Inhibitoren	25

<b>1.4</b>	<b>Arthrose</b>	26
1.4.1	<i>Definition</i>	26
1.4.2	<i>Nomenklatur</i>	26
1.4.3	<i>Ätiopathogenese</i>	26
1.4.4	<i>Diagnostik</i>	27
1.4.5	<i>Radiologische Klassifizierung der Arthrose</i>	28
1.4.6	<i>Klinik / Symptome</i>	29
1.4.7	<i>Therapie</i>	30
1.4.7.1	konservativ	30
1.4.7.2	operativ	31
<b>1.5</b>	<b>Sternum des Huhns</b>	33
<b>1.6.</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	34
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	36
<b>2.1</b>	<b>Zellkultur</b>	36
2.1.1	<i>Chondrocyten</i>	36
2.1.1.1	Präparation der Sterna	36
2.1.1.2	Verdau der Sterna	36
2.1.1.3	Präparation der Zell-Suspension	36
2.1.1.4	Vorbereitung der beschichteten Schalen	37
2.1.1.5	Agarose-Suspensionskultur	37
2.1.1.6	Kultivierung der Zellen	38
2.1.2	<i>Synovialflüssigkeit</i>	38
2.1.2.1	Synovialflüssigkeit	38
2.1.2.2	Herstellung des Synovial-Mediums	38
2.1.3	<i>Endothelzellen</i>	39
2.1.3.1	Herstellung konditionierter Medien	39
<b>2.2</b>	<b>Kollagenpräparation</b>	39
2.2.1	<i>aus Agarose</i>	39
2.2.2	<i>aus Kulturmedien</i>	40
<b>2.3</b>	<b>SDS-PAGE</b>	41
2.3.1	<i>Fluorographie</i>	41
<b>2.4</b>	<b>T4-ELISA</b>	42
<b>2.5</b>	<b>Immunoblot</b>	43

<b>2.6</b>	<b>Zymographie</b>	44
2.6.1	<i>Gelatine-Substrat-Zymographie</i>	44
2.6.2	<i>Casein-Substrat-Zymographie</i>	44
<b>2.7</b>	<b>Bestimmung der alkalischen Phosphatase</b>	45
<b>2.8</b>	<b>Bestimmung der sauren Phosphatase</b>	45
<b>2.9</b>	<b>Verwendete Lösungen und Reagenzien</b>	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	47
<b>3.1</b>	<b>Einfluß von late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit auf die Spätdifferenzierung von Hühner-Chondrocyten</b>	47
3.1.1	<i>Kraniale Chondrocyten</i>	48
3.1.2	<i>Kaudale Chondrocyten</i>	51
3.1.3	<i>Kaudale Chondrocyten mit einer Kulturdauer von 21 Tagen</i>	53
3.1.4	<i>Zellproliferation von kranialen und kaudalen Chondrocyten unter Einfluß von late-stage Arthrose - Synovialflüssigkeiten</i>	56
<b>3.2</b>	<b>Einfluß verschiedener löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spätdifferenzierung in Kultur mit late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit</b>	58
3.2.1	<i>Kraniale Chondrocyten</i>	58
3.2.1.1	T4, Thyroxin	59
3.2.1.2	IGF-I	62
3.2.1.3	MMP-3-Inhibitoren II	65
3.2.1.4	Protease-Inhibitoren und Komplexbildner	68
3.2.1.4.1	Leupeptin und Pepstatin	68
3.2.1.4.2	Weitere Protease-Inhibitoren	70
3.2.1.4.3	Komplexbildner	72
3.2.2	<i>Kaudale Chondrocyten</i>	75
3.2.2.1	Thyroxin, T4	75
3.2.2.2	IGF-I	78
3.2.2.3	MMP-3-Inhibitor II	81
3.2.2.4	Komplexbildner und Endopeptidase	84

<b>3.3</b>	<b>T4 – ELISA der verschiedenen Synovialflüssigkeiten</b>	86
3.3.1	<i>T4-ELISA der late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten</i>	87
3.3.2	<i>Einfluß von T4 und Proteasen auf die Chondrocyten-Spät differenzierung</i>	88
3.3.3	<i>Vergleich der T4-ELISAs von late-stage Arthrose- und Trauma-Synovialflüssigkeiten</i>	90
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	92
<b>4.1</b>	<b>Kann Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten die Chondrocyten-Spät differenzierung auslösen?</b>	93
4.1.1	<i>Kraniale Chondrocyten</i>	94
4.1.2	<i>Kaudale Chondrocyten</i>	95
4.1.3	<i>Kaudale Chondrocyten mit einer Kulturdauer von 21 Tagen</i>	95
<b>4.2</b>	<b>Einfluß löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spät differenzierung</b>	97
4.2.1	<i>Thyroxin, T4</i>	97
4.2.2	<i>IGF-I (Insulin-like growth factor-I)</i>	98
4.2.3	<i>MMP-3-Inhibitor II</i>	99
4.2.4	<i>Protease-Inhibitoren</i>	101
4.2.5	<i>Komplexbildner</i>	102
4.2.6	<i>Endopeptidase</i>	103
<b>4.3</b>	<b>Einfluß von Thyroxin aus Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten auf die Differenzierung von Chondrocyten</b>	104
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b>	106
	Literaturangaben	108
	Internetquellen	113
	Abkürzungen	114
	Danksagung	115
	Lebenslauf	116

## **1.1 Knorpel**

Der Knorpel zählt zum Binde- und Stützgewebe und entwickelt sich aus dem Mesoderm. Die Aufgaben des Knorpelgewebes gestalten sich vielfältig. Dazu gehört die Fähigkeit, sich bei Druck oder Zug zu verformen und Gewicht zu tragen. Diese beiden Charakteristika sind vor allem für die Bewegung des Skeletts unerlässlich. Zudem ist der Knorpel die Vorstufe für die durch Ossifikation entstehenden Knochen.

Knorpel hat weder Gefäße, noch Nerven oder Lymphgefäße, weswegen er auch als bradytrophes Gewebe bezeichnet wird. Die Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgt über Diffusion aus Kapillaren, die im Perichondrium oder dem subchondralen Knochen verlaufen oder über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit. Das straffe Bindegewebe, welches den Knorpel umgibt, wird Perichondrium (Knorpelhaut) genannt und enthält Typ-I-Kollagen-haltige Fibrillen.

Knorpelgewebe besteht aus Knorpelzellen (Chondrocyten) und charakteristischer extrazellulärer Matrix.

### **1.1.1 Knorpelarten**

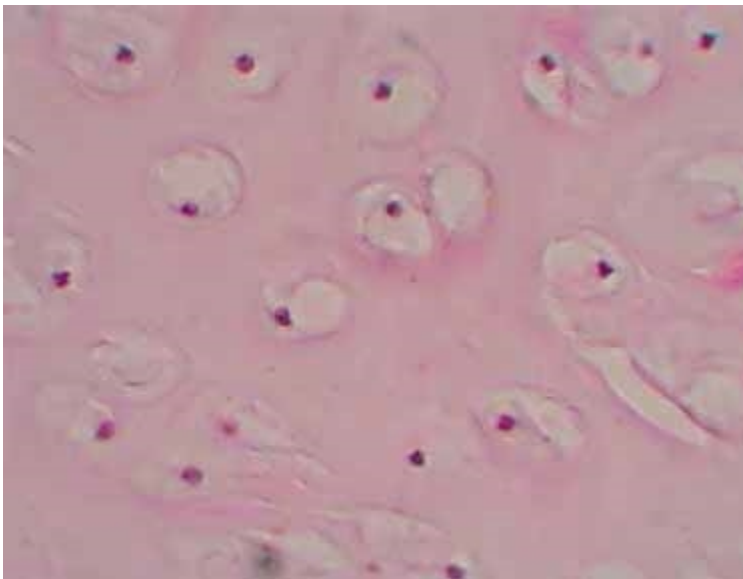
Man kann drei verschiedene Knorpelarten anhand der Morphologie und der extrazellulären Matrix (Horton, 1993) voneinander unterscheiden:

- Hyaliner Knorpel
- Elastischer Knorpel
- Faserknorpel

### 1.1.1.1 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist die am häufigsten im menschlichen Körper vorkommende Knorpelart. Er findet sich an Gelenkflächen, wo er auch als permanenter Knorpel bezeichnet wird, in der Epiphysenfuge, in der Trachea, an den ventralen Rippenansätzen und er bildet in der embryonalen Entwicklung zeitweise das Skelett als Ersatzknorpel in den Wachstumsfugen.

Hyaliner Knorpel stellt sich bläulich und milchig dar, die Chondrocyten liegen einzeln oder zu wenigen beieinander und sind von einem Knorpelhof umgeben. Diesen Knorpelhof sieht man histologisch nur nach Fixation des Gewebes und hat einen erhöhten Proteoglykangehalt, was zu einer vermehrten Basophilie des Knorpelgewebes führt. In der extrazellulären Matrix befinden sich Typ-II-Kollagen-haltige Fibrillen.



#### **Hyaliner Knorpel**

Präparat: Trachea,  
Mensch  
Färbung: HE

Vergrößerung:  
500x

**Abb.1:** Hyaliner Knorpel ([www.ruhr.de/.../histologie/...](http://www.ruhr.de/.../histologie/...))

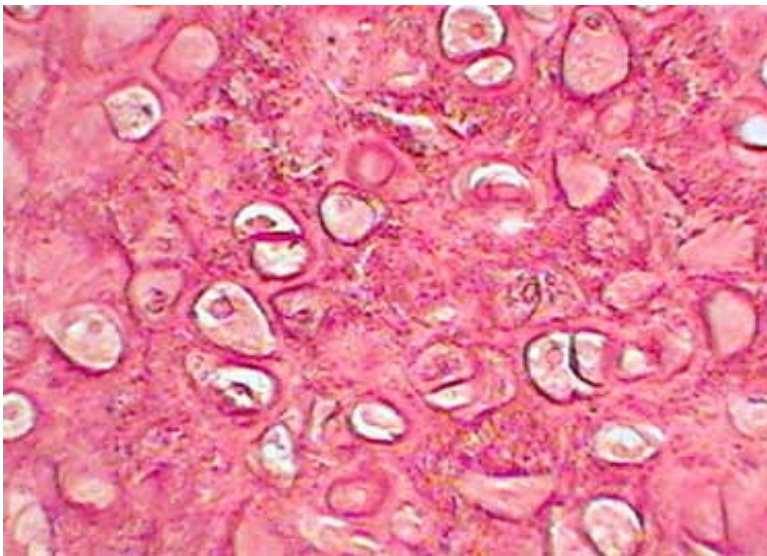
### 1.1.1.2 Elastischer Knorpel

Im Unterschied zum hyalinen Knorpel sind die Chondrocyten hier in kleineren Gruppen zusammengelagert und in der extrazellulären Matrix finden sich, neben Typ-II-Kollagen-haltigen Fibrillen, reichlich elastische Fasern. Das Elastin in diesen Fasern



bewirkt eine gelbliche Färbung des Knorpelgewebes und eine erhöhte Verformbarkeit. Mittels einer Orcein-Färbung kann die Verteilung der elastischen Fasern mikroskopisch dargestellt werden.

Der elastische Knorpel kommt in der Ohrmuschel, im äußeren Gehörgang und der Epiglottis vor.



**Elastischer  
Knorpel**

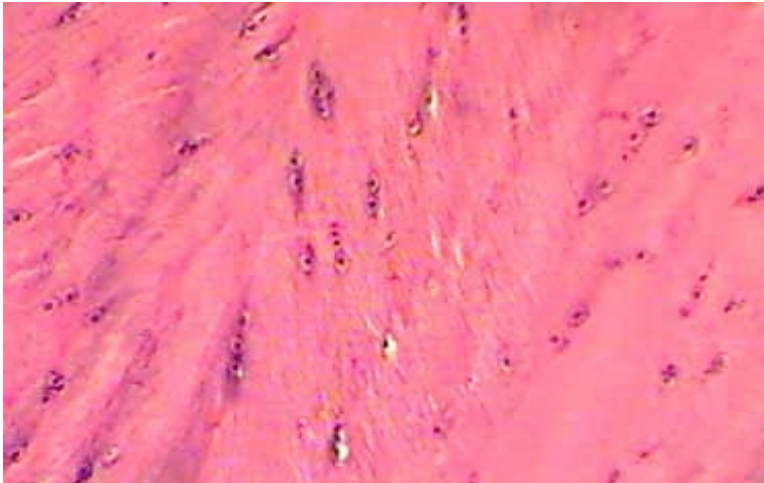
Präparat:  
Epiglottis, Schwein  
Färbung: Orcein

Vergrößerung:  
312x

**Abb.2** Elastischer Knorpel ([www.ruhr.de/.../histologie/...](http://www.ruhr.de/.../histologie/...))

### 1.1.1.3 Faserknorpel

Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Knorpeltypen besitzt der Faserknorpel kein Perichondrium, die Chondrocyten liegen einzeln oder in sehr kleinen Gruppen zwischen dicht angeordneten Typ-I-Kollagen-haltigen Fibrillen. Die extrazelluläre Matrix dieser Knorpelart ist azidophil, da die amorphe Interzellularsubstanz, die beim hyalinen Knorpel reichlich vorkommt, fehlt. Zu finden ist diese Knorpelart dort, wo größere Kräfte wirken und der Knorpel größeren Zugbelastungen standhalten muß, z.B. in den Disci intervertebrales, am Knochenansatz verschiedener Bänder und in der Symphysis pubica.



**Faserknorpel**  
 Präparat: Discus intervertebralis, Mensch  
 Färbung: HE  
 Vergrößerung: 156x

Abb.3 Faserknorpel ([www.ruhr.de/.../histologie/...](http://www.ruhr.de/.../histologie/...))

In der nachfolgenden Tabelle werden die verschiedenen Knorpeltypen noch einmal miteinander verglichen:

Tab.1: Knorpeltypen (aus: Theodor H Schiebler, Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie, Springer 1996)

	<b>Hyaliner Knorpel</b>	<b>Elastischer Knorpel</b>	<b>Faserknorpel</b>
<b>Lage der Chondrocyten</b>	einzeln oder wenige beieinander	einzeln oder in kleinen Gruppen	kleine Gruppen
<b>extrazelluläre Matrix</b>	reichlich Matrix überwiegend Typ-II-Kollagen	reichlich Matrix elastische Fasern Typ-II-Kollagen	wenig Matrix viele Kollagenfasern Typ-I-Kollagen Typ-II-Kollagen
<b>Eigenschaften</b>	druckelastisch nicht zugbelastbar	elastisch	wenig elastisch zugbelastbar
<b>Ort des Vorkommens</b>	Rippenknorpel Gelenkknorpel Trachealknorpel Nasenknorpel Kehlkopf: Cartilago thyroidea Cartilago cricoidea	Ohrknorpel  Kehlkopf: Cartilago epiglottica	Symphyse Discus intervertebralis Gelenkknorpel: Kiefergelenk

### 1.1.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes setzt sich aus drei wesentlichen Komponenten zusammen:

- Wasser
- Glykane
- Kollagene und faser-assoziierte Proteine

Je nach Art des Knorpelgewebes findet sich eine andere Zusammensetzung dieser drei Komponenten. Eine weitere Unterscheidung der extrazellulären Matrix kann in fibrilläre und extrafibrilläre Komponenten vorgenommen werden, wobei hier die fibrilläre Komponente hauptsächlich aus Kollagen und die extrafibrilläre Komponente hauptsächlich aus Proteoglykanen bestehen. Die Proteoglykane besitzen stark geladene Seitenketten, die das Wasser binden und somit die Druckelastizität des Knorpels gewährleistet.

#### 1.1.2.1 Glykane

Die Glykane sind in der extrazellulären Matrix in zwei Hauptformen vorzufinden. Einmal als Hyaluronsäure und einmal als Proteoglykane.

##### 1.1.2.1.1 Hyaluronsäure

Hierbei handelt es sich um ein Makromolekül, das sich aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin zusammensetzt, extrem lang ist und dessen molare Masse oberhalb von einer Million liegt. Hyaluronsäure ist nicht sulfatiert und an kein Protein kovalent gebunden.

##### 1.1.2.1.2 Proteoglykane

Es handelt sich hierbei um Gruppen von Proteinen, von denen unverzweigte Glykosaminoglykanketten ausgehen. Das zentrale Protein wird auch *core protein* genannt. Dieses *core protein* ist gestreckt und hat z.B. bei dem Protein Aggrecan ein

Molekulargewicht von 210.000 (siehe Tab. 2). Die Glykosaminoglykanketten gehen hierbei gerade vom *core protein* ab, so daß das Molekül in seinem Aussehen durchaus mit einer Bürste vergleichbar ist. Hyaluronsäure wird durch ein *link protein* mit dem Proteoglykan verbunden.

**Tab.2:** Übersicht über die ausschließlich im Knorpel vorhandenen nicht-kollagenen Matrixproteine, CS-Chondroitinsulfat, KS-Keratansulfat (Modifiziert aus Heinegard und Oldberg, 1993)

<b>Protein</b>	<b>relative molekulare Masse</b>	<b>GAG-Ketten</b>	<b>Eigenschaften, Funktionen, Vorkommen</b>
Aggrecan	210.000 (core protein)	CS, KS	am häufigsten vorkommendes Proteoglykan; Bindung an Hyaluronsäure
Anchorin	34.000 (Sequenz)		Bindung an Kollagen II; verankert Kollagen an Chondrocyten
Ch21	21.000 (SDS-PAGE)		Bindung von Fettsäuren; Produkt hypertropher Chondrocyten
Collagen II C-terminales Propeptid (Chondrocalcin)	Trimer aus Untereinheiten mit $M_r$ 35.000		Funktion nicht bekannt; Bindung an Hydroxyapatit, Bindung an Annexin
COMP (cartilage oligomerie matrix protein)	Pentamer aus Untereinheiten mit $M_r$ 100.000		Bindung an Kollagene Fibrillenkomponente

### 1.1.2.2 Kollagene

Bei Kollagenen handelt es sich um Strukturproteine der extrazellulären Matrix. Es kommt sowohl beim Menschen als auch beim Tier vor, ist sehr zugfest und nicht dehnbar. Das Kollagen macht im menschlichen Körper einen Hauptteil des

Gesamteiweißes aus und ist in Knochen, Sehnen, Bändern und der Haut zu finden. Ursprünglich wurden Kollagene auch als Knochenleim im Tischlerberuf benutzt, daher auch der Name aus dem Griechischen: Kollagen = Leim erzeugend.

#### 1.1.2.2.1 Typ-I-Kollagen

Typ-I-Kollagen zählt zu den fibrillären Kollagenen, welche eine 300 nm lange, seilartige Tripelhelix aufweisen. Diese Tripelhelix wird von 3 Polypeptidketten gebildet, die jeweils für sich gesehen rechtshändig sind und sich dann zu einer linkshändigen Tripelhelix zusammenschließen.

Die Primärstruktur dieser drei Polypeptidketten ist durch repetitive Aminosäuresequenzen (Gly-X-Y) charakterisiert. An jeder dritten Position in dieser Sequenz befindet sich die Aminosäure Glycin, Prolin kann sehr häufig der Position X und Hydroxyprolin der Position Y zugeordnet werden.

Im rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) der Zellen werden die Vorläufer-Kollagen-Ketten gebildet, diese Vorläufermoleküle besitzen N- und C-terminale Propeptide. Durch Hydroxylierung der Aminosäuren Lysin oder Prolin, Bildung von Wasserstoffbrücken und Disulfidbindungen im Lumen des RERs kommt es zur Entstehung eines Prokollagen-Helixmoleküls. Im Verlauf der weiteren Biogenese der Matrix werden durch Prokollagen-Peptidasen die N- und C-terminalen Propeptide abgespalten. Anschließend lagern sich die Kollagene zu Fibrillen zusammen, die eine Querstreifung aufweisen. Dieses Bandmuster wiederholt sich in Kollagen-I-haltigen Fibrillen alle 67 nm (234 Aminosäuren).

Zu finden ist Typ-I-Kollagen vor allem in Faserknorpel. Dieser Knorpel muß sehr zugfest sein und ist in der Symphysis pubica und den Disci intervertebrales anzutreffen.

#### 1.1.2.2.2 Typ-II-Kollagen

Auch Typ-II-Kollagen zählt zu den fibrillären Kollagenen mit einer zentralen tripelhelikalen Domäne. Im gesamten Knorpelgewebe macht dieser Typ von Kollagen etwa 85% aus. Typ-II-Kollagen ist sowohl im hyalinen als auch im elastischen Knorpel und im Faserknorpel zu finden. Der hyaline Knorpel ist auf Gelenkoberflächen, im

Nasen- und Rippenknorpel sowie im Kehlkopf zu finden, der elastische Knorpel ist der vorherrschende Knorpel in der Ohrmuschel und Epiglottis.

Wie schon bei Typ-I-Kollagen wird ein Kollagen-Vorläufermolekül mit N- und C-terminalen Propeptiden gebildet, die dann extrazellulär durch Peptidasen abgespalten werden. Anders als bei Typ-I-Kollagen ist das Typ-II-Kollagen ein Homotrimer  $[\alpha 1(\text{II})]_3$ , in dem viel Hydroxyprolin vorkommt. Das Kollagen ist im Knorpel von einer amorphen Grundsubstanz umgeben, dessen Brechungsindex dem des Kollagens entspricht. Man sagt auch die Kollagenfibrillen seien maskiert. Erst wenn es aufgrund von Degeneration oder anderen Ursachen zu einem Flüssigkeitsverlust im Knorpel kommt, werden die Kollagenfibrillen demaskiert, was auf einen pathologischen Zustand schließen läßt. Hervorragend lassen sich die Kollagenfasern hingegen mit einem Elektronenmikroskop darstellen.

#### 1.1.2.2.3 Typ-X-Kollagen

Kollagen X gilt als Marker für den hypertrophen Zustand von Knorpelzellen und wird ausschließlich von hypertrophen Chondrocyten synthetisiert (Schmid und Linsenmayer, 1987).

Im Gegensatz zu den beiden vorausgegangenen Kollagen-Typen bildet Typ-X-Kollagen keine Fibrillen aus, sondern gehört zu der Gruppe der Netzwerk-bildenden Kollagene. Das Typ-X-Kollagen besitzt eine zentrale tripelhelikale Domäne mit einer kleinen N-terminalen und einer großen C-terminalen Domäne mit einem Molekulargewicht von ca. 59 kDa.

Immunhistochemisch können beim Kollagen X zwei unterschiedliche Suprastrukturen nachgewiesen werden. Zum einen ist Kollagen X als Filamente in möglicher hexagonaler Anordnung um Knorpelzellen zu finden (Schmid et al., 1994), zum anderen ist Kollagen X aber auch mit quergestreiften Fibrillen assoziiert (Poole und Pidoux, 1989).

Über die genaue Funktion von Typ-X-Kollagen konnten bisher jedoch keine genauen Aussagen gemacht werden.

#### 1.1.2.2.4 Typ-IX-Kollagen

Kollagen Typ IX zählt zu den FACIT-Kollagenen (*fibril associated collagens with interrupted triple helices*). Es besteht aus drei Ketten,  $\alpha 1(\text{IX})$ ,  $\alpha 2(\text{IX})$  und  $\alpha 3(\text{IX})$ , die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zu finden ist das Kollagen IX in der Cornea, im Glaskörper und in der Chorda dorsalis (Swiderski und Solursh, 1992; Savontaus et al., 1998). Der größte Teil des Moleküls befindet sich auf der Oberfläche von Kollagen-Typ-II-Fibrillen. Mäuse mit einem Kollagen-IX-Knock-out Gendefekt zeigen arthrotische Gelenkveränderungen (Olsen, 1996). Dies läßt einen protektiven Aspekt des Kollagen IX gegen eine mechanische Abnutzung des Knorpels oder einen direkten Effekt auf die metabolische Aktivität der Knorpelzellen vermuten.

#### 1.1.2.2.5 Typ-XI-Kollagen

Kollagen XI zählt neben Kollagen II zu den fibrillären Kollagenen und liegt als Heterotrimer  $\alpha 1(\text{XI})$ ,  $\alpha 2(\text{XI})$  und  $\alpha 3(\text{XI})$  vor. Mäuse mit einem homozygoten Defekt der  $\alpha 1(\text{XI})$ -Kette sterben bei der Geburt (Li et al., 1995). Es wird angenommen, ähnlich wie bei Kollagen IX, daß Kollagen XI an der Regulation des Fibrillendurchmessers beteiligt ist, da im Knorpel dieser Mäuse statt Fibrillen breit gebänderte Aggregate gefunden werden.

## 1.2 Knochenentwicklung

### 1.2.1 Desmale Ossifikation (*Osteogenesis membranacea*)

Die Knochenbildung beim Menschen kann auf zweierlei Art und Weise geschehen; einmal durch die desmale und einmal durch die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entsteht der Knochen direkt aus mesenchymalem Bindegewebe und wird damit auch direkte Ossifikation genannt, da es ohne Zwischenstufen zur Bildung von Knochen kommt.

Knochen, die durch desmale Ossifikation entstehen sind Schädelknochen, wie z.B. das Os parietale, Os frontale sowie Teile des Os temporale, der Maxilla und der Mandibula.

In Abbildung 4 ist zu erkennen, daß der Ausgangspunkt für die desmale Ossifikation die Vermehrung und Umwandlung von mesenchymalen Zellen (Vorläuferzellen) in Osteoblasten ist. Außerdem kommt es in diesem Gebiet, das auch Ossifikationszentrum genannt wird, zu einer stärkeren Kapillarisation.

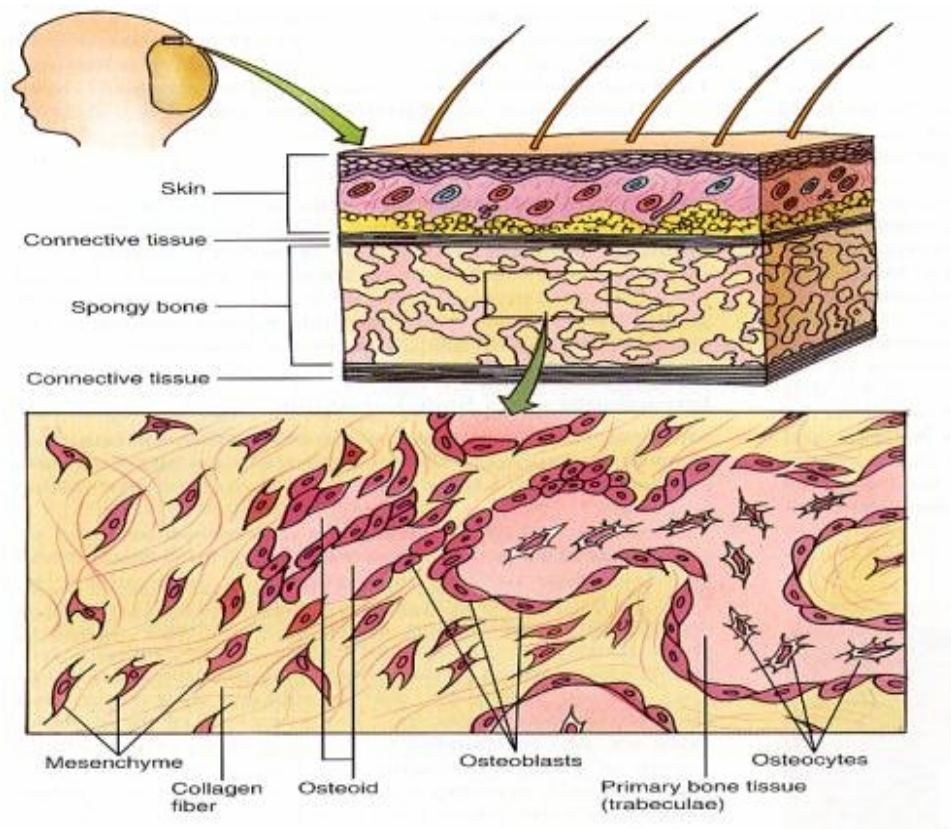


Abb. 4: schematische Darstellung der desmalen Ossifikation aus: **Gartner and Hiatt, Color Textbook of Histology, p. 122, Figure 7-12.**

Osteoblasten in den Zentren produzieren Knochenmatrix, das Osteoid, das dann verkalkt und die Osteoblasten ganz oder teilweise einmauert. Die so entstehenden Knochenbalken ermöglichen es weiteren Osteoblasten, sich auf deren Oberfläche zu einer zusammenhängenden Schicht zu formieren. Diese epithelartige Anordnung gewährleistet einen weiteren "Anbau" von Knochensubstanz, der zu einem Wachstum führt.



## 1.2.2 *Chondrale Ossifikation (Osteogenesis cartilaginea)*

Bei der chondralen Ossifikation geht der Knochen aus einem vorher bestehenden Knorpelmodell hervor. Da die Knochen nicht direkt aus dem Mesenchym entstehen, wird die Art der Knochenentwicklung auch indirekte Ossifikation genannt und ist bei langen Röhrenknochen vorherrschend. Es können bei der chondralen Ossifikation zwei zeitlich etwas gegeneinander versetzte Vorgänge unterschieden werden;

- die *perichondrale Ossifikation* (Ossificatio perichondralis); hier geht die Neubildung des Knochens vom Perichondrium aus
- die *enchondrale Ossifikation* (Ossificatio enchondralis)

### 1.2.2.1 Perichondrale Ossifikation

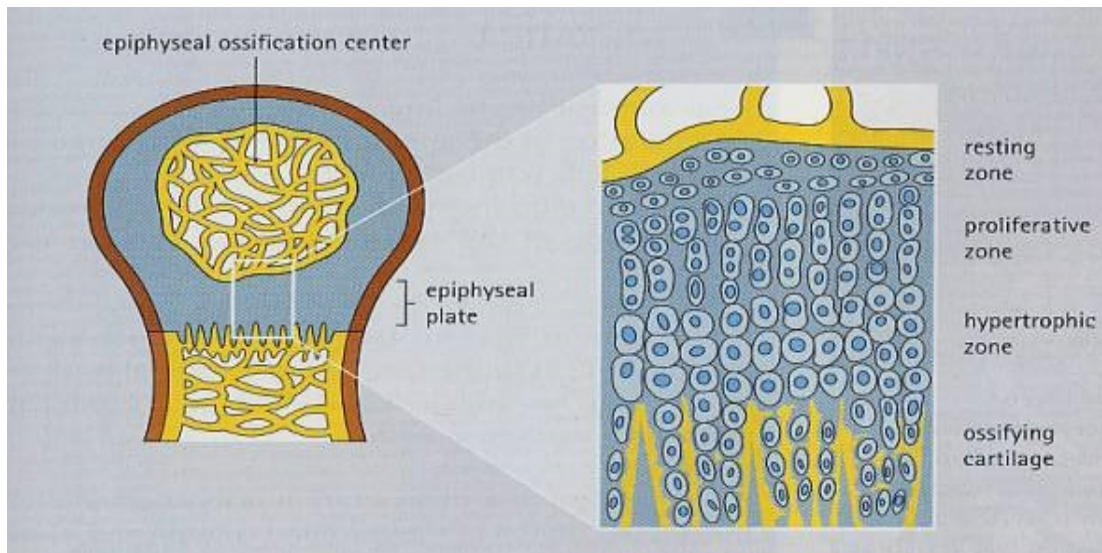
Hier beginnt die Ossifikation an den Diaphysen (Schäfte) der Knorpelmodelle. Es werden aus mesenchymalen Zellen des perichondralen Bindegewebes Osteoblasten gebildet. An den Oberflächen der Diaphysen bilden sich desmale Ossifikationszentren, so daß rund um das Knorpelmodell eine Knochenmanschette entsteht, die bis zu den Epiphysen (Enden) reicht. Der Knorpel unterhalb der Knochenmanschette wird nicht mehr ausreichend versorgt und induziert damit eine Hypertrophie der Chondrocyten und es kommt zur enchondralen Ossifikation.

### 1.2.2.2 Enchondrale Ossifikation

Ort des Geschehens ist bei der enchondralen Ossifikation die Epiphysenplatte, gelegen zwischen der Diaphyse (Knochenschaft) und der Epiphyse (Knochenende) eines Knochens. Die Aktivität in der Epiphysenplatte bleibt solange erhalten, wie sich der entsprechende Knochen im Wachstum befindet.

Es kommt zunächst zu einer Hypertrophie und einem anschließenden Abbau der Chondrocyten. Zurück bleiben verkalkte Septen, in die Gefäße und Mesenchymzellen einwandern. Die Mesenchymzellen entwickeln sich zu Osteoblasten, die auf der restlichen Oberfläche des Knorpelgewebes Knochen bilden.

Wie in Abbildung 5 gut zu erkennen ist, läuft die Knochenbildung in der Epiphysenplatte in verschiedenen Zonen ab, die man mit dem Mikroskop sehr gut unterscheiden kann:



**Abb.5:** schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation aus: **Stevens and Lowe, Human Histology** p. 247, Figure 13.25

#### 1.2.2.2.1 Reservezone (Zona reservata cartilaginis)

Die Knorpelzellen in diesem Bereich sind typische hyaline Knorpelzellen, die sich klein und rund darstellen. Die Zellen produzieren und sezernieren Kollagen II, IX, XI und das Proteoglykan Aggrecan, das in der extrazellulären Matrix in diesem Bereich der Wachstumsfuge reichlich zu finden ist (Goldring et al., 2006).

#### 1.2.2.2.2 Proliferationszone (Zona proliferativa)

Die Zone ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Teilungsrate der Chondrocyten, die sich dann in Längsrichtung zu Säulen anordnen. Aufgrund dieser Strukturierung wird dann auch von Säulenknorpel gesprochen. Die Interzellulärschubstanz nimmt im Vergleich zur Reservezone ab. Die Knorpelzellen produzieren, wie in der Reservezone, Kollagen II, IX und XI und Aggrecan.

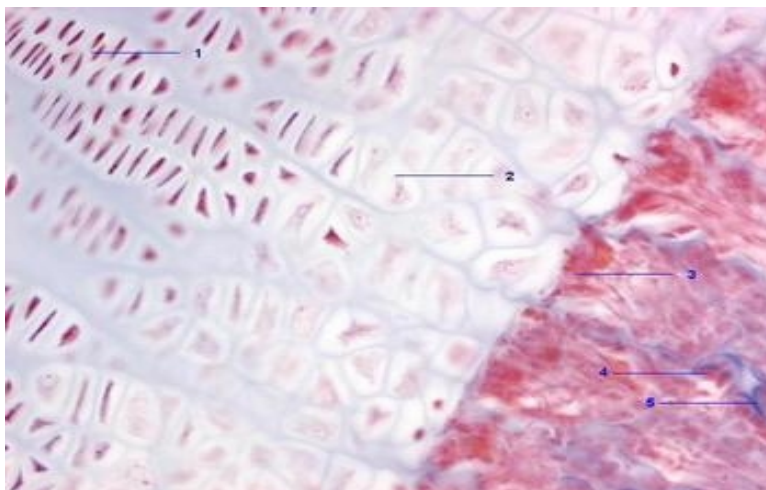
#### 1.2.2.2.3 Resorptionszone (Zona resorbens cartilaginea)

Die Chondrocyten in dieser Zone hypertrophieren und bilden Hydroxylapatitkristalle, die dann zu einer Kalzifizierung führen. Wegen der stark hypertrophierten Chondrocyten wird in dieser Zone auch von Blasenknorpel gesprochen. Die Interzellulärsubstanz nimmt immer weiter ab. In dieser Zone ist Kollagen X und alkalische Phosphatase nachweisbar.

#### 1.2.2.2.4 Verknöcherungszone (Zona ossificationis)

Die Chondrocyten gehen zugrunde und werden von Chondroklasten abgebaut. In die so entstehenden Knorpelhöhlen wachsen Blutgefäße sowie undifferenzierte Mesenchymzellen ein. Aus den undifferenzierten Zellen werden Osteoblasten, die Knochengrundsubstanz bilden. So entstehen Knochenbälkchen, die im Inneren aus verkalktem Knorpel bestehen und oberflächlich Knochengewebe aufweisen.

Zuletzt im Verlauf der Entwicklung eines Röhrenknochens verknöchert die Epiphyse. Im epiphysealen Ossifikationszentrum schreitet der Umbau, im Gegensatz zur Epiphysenplatte, radiär fort.



**Abb.6:** Mikroskopieaufnahme der enchondralen Ossifikation  
1 Säulenknorpel (Proliferationszone) 2 Blasenknorpel (Resorptionszone)  
3 Ossifikationszone 4 Osteoblast 5 Verkalkte Knorpelgrundsubstanz ([www.kgu.de](http://www.kgu.de))

Diese epiphysealen Verknöcherungszentren der verschiedenen Knochen treten zu unterschiedlichen Lebenszeiten auf, so daß anhand der Knochen auf das ungefähre Alter eines Individuums geschlossen werden kann. So verknöchert die hintere und sphenoidale Schädelnaht im 2- 3 Monat nach der Geburt, die Verknöcherung der Wirbelbögen erfolgt ab den 3. Lebensjahr und als letzte Epiphysenfuge verknöchert in der Regel die Epiphysenfuge der Clavicula um das 20. Lebensjahr herum. Beim Erwachsenen stellen sich sämtlich Epiphysenfugen verknöchert dar.

## **1.3 Einfluß löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spätdifferenzierung**

### **1.3.1 Thyroidhormone (Thyroxin, Trijodthyronin)**

Die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T<sub>4</sub>) und Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) werden in den Schilddrüsenfollikeln gebildet. Im Blut werden diese beiden Hormone überwiegend proteingebunden transportiert, wobei Albumin, thyroxinbindendes Präalbumin und thyroxinbindendes Globulin den Hauptteil dieser Trägerproteine bilden. Es wird vorwiegend T<sub>4</sub> sekretiert (Schimmel und Utiger, 1977), welches dann im peripheren Blut durch Dejodinerung teilweise zu T<sub>3</sub> umgewandelt wird und später in der Zielzelle kommt es zu einer weiteren Dejodinerung von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub>.

Reguliert wird diese Hormonbildung in der Schilddrüse über den Hypothalamus mittels Thyreotropin Releasing Hormon (TRH), welches dann im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung von Thyroidea Stimulierendem Hormon (TSH) bewirkt. TSH stimuliert die Bildung und Sekretion von T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> sowie das Größenwachstum der Schilddrüse. Ist genügend T<sub>4</sub> im Blut vorhanden, hemmt T<sub>4</sub> über eine negative Rückkopplung im Hypothalamus die Ausschüttung von TRH.

Die Konzentration von T<sub>4</sub> im Serum liegt zwischen ca. 5-14 µg/dl.

Die Wirkungen von T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> im menschlichen Organismus sind sehr vielfältig. Diese beiden Hormone stimulieren die Synthese vieler Enzyme und Proteine, die vorallem auch in der Entwicklung wichtig sind, z.B. bei der Hirnentwicklung oder dem Längenwachstum des Knochens. Es wird vermutet, daß Thyroxin indirekt über eine Erhöhung der Wachstumshormonsekretion das Knochenwachstum reguliert.

### **1.3.2**      *Insulin-like growth factor I (IGF-I)*

IGF-I zählt zu den sogenannten Somatomedinen. Wegen ihrer insulinähnlichen Struktur bezeichnet man die Gruppe der Somatomedine auch als “insulin-like growth factors“.

Unter Einfluß von Somatotropin (Wachstumshormon) wird dieses Peptid sowohl in der Leber als auch teilweise von den Chondrocyten selbst synthetisiert und kann eine Zellproliferation in der Reservezone fördern und eine Hypertrophie von kompetenten Chondrocyten unterstützen (Nilsson et al., 2005; Van der Eerden et al., 2003).

Der Einfluss von IGF-I auf die Chondrocyten-Spät differenzierung wird deutlich, betrachtet man Mäuse bei denen eine Deletion des IGF-I Gens vorliegt, hier kommt es zu Zwergwuchs (Liu et al., 1993; Woods et al., 1996) mit einer schmaleren hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge (Wang et al., 1999).

### **1.3.3**      *Proteasen und Protease-Inhibitoren*

In früheren Arbeiten zur Chondrocyten-Differenzierung in vitro (Bittner et al., 1997; Barbarina et al., 2001) wurde gezeigt, daß Proteasen eine Rolle in der Differenzierung spielen. Kaudale Chondrocyten können ihre eigene Spät differenzierung durch lösliche Faktoren hemmen (Böhme et al., 1995). Diese negative Regulierung kann unter Einfluß von Proteasen aufgehoben werden. Bittner zeigte, daß Endothelzell-Proteasen die Blockierung der Spät differenzierung von kaudalen Chondrocyten unter Beteiligung von Thyroxin aufheben konnten. Barbarina stellte unter anderem fest, daß Matrix-Metalloproteinasen am Prozess der Chondrocyten-Spät differenzierung beteiligt sind. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Proteasen und Protease-Inhibitoren eingesetzt, die hier näher beschrieben werden sollen.

#### **1.3.3.1**      Chymotrypsin

Chymotrypsin ist eine Serinprotease und wird physiologischerweise vom Pankreas als inaktive Vorstufe (Chymotrypsinogen) ins Darmlumen abgegeben. Aktiviert wird Chymotrypsinogen im Darmlumen dann von Trypsin zu Chymotrypsin. Durch

Hydrolyse von Peptidbindungen werden Proteine während des Verdauungsvorgangs im Darm von Chymotrypsin aufgespalten. Chymotrypsin hat ein breites Substratspektrum und könnte unter anderem sowohl hypertrophiehemmende Faktoren als auch deren Rezeptoren proteolytisch so verändern, daß diese inaktiviert werden.

### 1.3.3.2 o-Phenanthrolin und EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)

Bei den beiden Verbindungen handelt es sich um Chelat-Bildner (von lat.: chelae = Schere). Andere Enzyme, z.B. Metalloproteinasen benötigen Metallionen für ihre Aktivität im aktiven Zentrum. Diese Enzyme lassen sich mittels Chelatkomplexbildner inhibieren. Hierbei bindet z.B. EDTA an die Metallkationen im Aktivzentrum der Metalloproteasen, bildet mit ihnen einen Komplex und inaktiviert das Zentrum auf diese Weise.

### 1.3.3.3 Sonstige Protease-Inhibitoren

Des Weiteren wurden in den folgenden Versuchen neben EDTA noch weitere Protease-Inhibitoren mit unterschiedlichen inhibierenden Wirkungen verwendet. *Aprotinin* hemmt die Gerinnungsfaktoren XIIa, XIa und VIII, sowie Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin. *Pepstatin* ist ein Aspartat-Protease-Inhibitor. Die Serin- und Cysteinproteasen werden durch *Leupeptin* gehemmt. *Aprotinin* hemmt ebenfalls Serinproteasen. *E64* inhibiert Cystein-Proteasen.

Zudem wurde der MMP-3 Inhibitor II (Matrix-Metallo-Protease-Inhibitor II) von Calbiochem verwendet, der laut Hersteller MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 hemmt. Dieser Protease-Inhibitor kommt in vivo allerdings nicht vor und ist als Untersuchungstool genutzt worden.

## 1.4 Arthrose

### 1.4.1 Definition

Die Arthrose ist ein degenerativer Prozess im Gelenk, bei dem durch ein Mißverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit des Gelenks Schäden an den Knorpeloberflächen der verbindenden Gelenkpartner entstehen. Außerdem werden nicht nur Schäden am Knorpel beobachtet, sondern auch pathologische Veränderungen am gelenknahen Knochen, an der Muskulatur und der Gelenkkapsel.

### 1.4.2 Nomenklatur

Tabelle 3 erklärt die gebräuchlichen Bezeichnungen für Arthrose in Abhängigkeit ihrer Lokalisation;

Tab.3: ( O.P.I.S. Dr. Gumpert & Dr. Jungermann )

Gonarthrose	Kniegelenksarthrose
Coxarthrose	Hüftgelenksarthrose
Omarthrose	Schultergelenksarthrose
Spondylarthrose	Arthrose der Wirbelsäule
Rhizarthrose	Daumensattelgelenksarthrose

### 1.4.3 Ätiopathogenese

Es wird eine primäre und sekundäre Arthrose unterschieden. Die Ursache der *primären Arthrose* ist noch nicht bekannt, man bezeichnet sie daher auch als idiopathische Arthrose.

Bei den *sekundären Arthrosen* sind die Ursachen bekannt. Sekundäre Arthrosen sind meist Folge von Fehlstellungen, Unfällen mit bleibenden Gelenkschäden, Infektionen und Übergewicht. Form- und Funktionsstörungen eines Gelenks oder dessen Umgebung, die zur Arthrose führen, werden präarthrotische Deformitäten genannt. Die

häufigste Form der Arthrose ist jedoch die ideopathische Arthrose. Bei Polyarthrose sind mehrere Gelenke gleichzeitig betroffen.

In Tabelle 4 sind einige Ursachen für eine sekundäre Arthrose aufgeführt:

**Tab. 4:** Ursachen für sekundäre Arthrose (nach O.P.I.S. Dr. Gumpert & Dr. Jungermann)

<b>angeborene</b>	<b>Wachstumsalter</b>	<b>endokrin, systemisch, metabolisch</b>	<b>neurologisch</b>	<b>mechanisch/ Trauma</b>
Hüftdysplasie	M. Perthes	M. Wilson	Charcot-Arthrose	Frakturen
Coxa valga/ vara	Epiphysiolysis capitis femoris	Akromegalie	Polyneuropathie	Überlastung
Chondromatosen	posttraumatisch	Hyperpara- thyreoidismus	Syringomyelie	iatrogen
Fußfehlstellungen				Übergewicht

#### **1.4.4**      *Diagnostik*

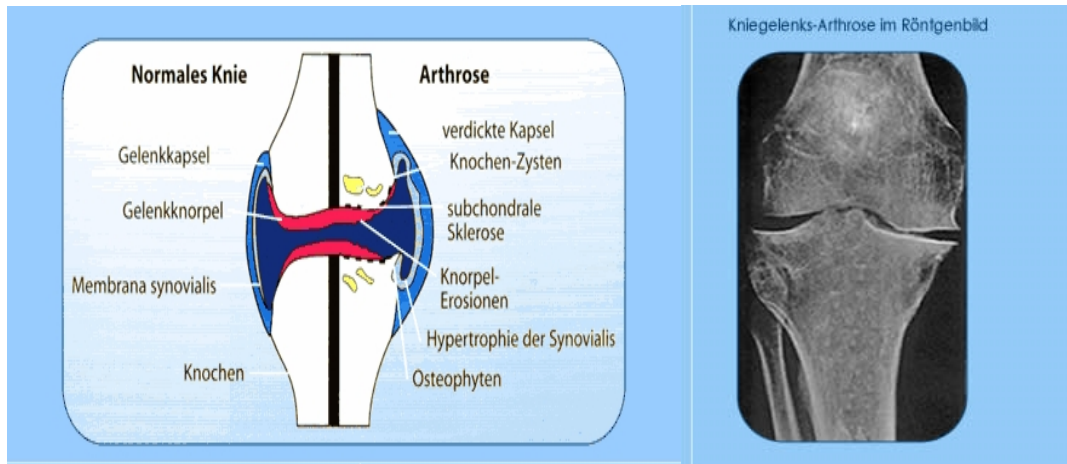
Die wichtigste Untersuchung zur Bestätigung einer Arthrose stellt die Röntgenaufnahme dar. Anhand von radiologischen Auffälligkeiten läßt sich dann auch ein Schweregrad der Arthrose ermitteln (siehe 1.1.4). Man kann folgende pathologische Veränderung bei Röntgenaufnahmen von arthrotischen Gelenken feststellen:

- eine Verschmälerung des Gelenkspalts
- Bildung von Osteophyten (knöcherne Anbauten am Gelenkspalt)
- subchondrale Sklerosierung (Verdichtung des Knochens unterhalb des Knorpels)
- Geröllzysten (Defekte des Knochens)

In der Anamnese zeigt sich bei den betroffenen Patienten eine typische Krankengeschichte mit Anlaufschmerz, Schwellung, wetterabhängigen Schmerzen und Muskelverspannungen. Für den Arzt äußerlich sichtbar sind Schwellungen und Deformitäten, sowie ein auffälliges Gangbild (z.B. bei Coxarthrose).

Zur Diagnosestellung können weiterhin Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), Gelenksspiegelungen (Arthroskopien), Szintigraphie und Sonographie hinzugezogen werden.





**Abb.7:** Radiologische Veränderung des Gelenks bei Arthrose (schematisch + Röntgenbild)  
(www.arthrose-zentrum.de)

### 1.4.5 Radiologische Klassifizierung der Arthrose

**Tab.5:** Klassifizierung der Arthrose nach Mankin (Mankin et al., 1971).

Variable	Score
Surface	0 = normal
	1 = irregular
	2 = fibrillation / vacuoles
	3 = blisters and erosion
Hypocellularity	0 = normal
	1 = small decrease in chondrocytes
	2 = large decrease in chondrocytes
	3 = no cells
Clones	0 = normal
	1 = occasional duos
	2 = duos or trios
	3 = multiple nested cells
Alcianophilia	0 = normal
	1 = small decrease in color
	2 = large decrease in color
	3 = no color

Die Einteilung der Arthrose nach histologischen Kriterien von Mankin et al. 1971 demonstriert Tab.5. Darüber hinaus veranschaulicht Tab.6 die Stadieneinteilungen der Arthrose nach radiologischen Merkmalen von Ahlbäck bzw. Kellgren und Lawrence

(Ahlbäck S., Osteoarthritis of the knee: a radiographic investigation, 1968, Kellgren et al., 1963, Lawrence et al., 1966).

**Tab.6:** Arthrorestadien (Ingemar F Petersson et al., Ann Rheum Dis 1997;56:493-496 ( August )

<b>Ahlbäck Grad</b>	<b>Ahlbäck Definition</b>	<b>Kellgren &amp; Lawrence Grad</b>	<b>Kellgren &amp; Lawrence Definition</b>
		<b>Grad 1</b> zweifelhaft	sehr kleine Osteophyten, zweifelhafte Wichtigkeit
		<b>Grad 2</b> minimal	deutliche Osteophyten, keine Gelenkspaltverengung
<b>Grad I</b>	Gelenkspaltverengung (Gelenkspalt < 3 mm)	<b>Grad 3</b> mäßig	mäßige Verengung des Gelenkspalts
<b>Grad II</b>	Gelenkspalt ist nicht mehr vorhanden	<b>Grad 4</b> schwer	starke Gelenkspaltverengung mit subchondraler Knochensklerose
<b>Grad III</b>	geringer Knochenabrieb (0-5 mm)	<b>Grad 4</b> schwer	starke Gelenkspaltverengung mit subchondraler Knochensklerose
<b>Grad IV</b>	mäßiger Knochenabrieb (5-10 mm)	<b>Grad 4</b> schwer	starke Gelenkspaltverengung mit subchondraler Knochensklerose
<b>Grad V</b>	schwerer Knochenabrieb (>10 mm)	<b>Grad 4</b> schwer	starke Gelenkspaltverengung mit subchondraler Knochensklerose

#### 1.4.6 *Klinik / Symptome*

Die Klinik dieser Erkrankung gestaltet sich vielfältig. Die Symptome beginnen meist schleichend und sind durch einen wechselnden Verlauf gekennzeichnet. Die Beschwerden reichen von Schmerz, Schwellung, Gelenkerguß, Muskelverspannung bis hin zu Funktionsverlust des Gelenks, Bewegungseinschränkung und zunehmender Deformität des Gelenks.

Die Patienten beschreiben den Schmerz charakteristisch als Anlaufschmerz, d.h. wenn der Patient nach einer längeren Ruhephase das Gelenk wieder belastet, ist dies sehr schmerzhaft. Nach dieser Anlaufphase und einigen Minuten in Bewegung jedoch bessert es sich und der Schmerz ist deutlich gelindert.



**Abb.8:** deutliche Deformität der Fingerendgelenke bei einer Heberden-Arthrose ([www.onmeda.de](http://www.onmeda.de))

### 1.4.7 *Therapie*

Eine Therapie, die die Ursachen der Arthrose beheben kann, gibt es nicht. Man ist nur in der Lage, die Symptome dieser Erkrankung zu behandeln und eine schnelle Progredienz zu verhindern.

Die meisten Patienten haben eher milde Symptome, weshalb die Therapie bei diesen Menschen konservativ gehalten wird. Erst wenn sich die Symptome verschlimmern greift man operativ ein.

#### 1.4.7.1 konservativ

Zur konservativen Therapie zählt zunächst die Aufklärung über die Erkrankung. Dem Patienten muß verständlich gemacht werden, daß man durch gewisse Umstellungen im Lebensstil eine Verbesserung der Symptome erreichen kann. Dazu zählen Gewichtsabnahme bei Übergewicht und sportliche Aktivität, durch z.B. Krankengymnastik. Diese beiden Maßnahmen sollen zur Vermeidung von unphysiologischen Haltungen in den betroffenen Gelenken und damit zu Schmerzreduktion führen. Zudem wird die Beweglichkeit verbessert und verkürzte Muskeln werden gedehnt.

Weitere nicht-chirurgische Maßnahmen sind Schmerzmittel, die auch entzündungshemmend wirken (nichtsteroidale Antirheumatika wie Ibuprofen, Diclofenac), physikalische Therapie und Orthopädietechnik.

#### 1.4.7.2 operativ

Bei einem kleinen Teil der Patienten mit Arthrose führt die konservative Therapie zu keiner Verbesserung der Symptome und es wird eine operative Therapie in Betracht gezogen. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten dem betroffenen Patienten zu helfen; Umstellungs-osteotomien, Knorpelzell-Transplantationen, Arthrodesen und letztendlich die partielle oder totale Endoprothese.

Die partielle oder totale Endoprothese wird bei jüngeren Patienten nur selten vorgenommen, da die Prothesen nur eine begrenzte Haltbarkeit von etwa 10-15 Jahren haben. Die Operation zum Wechsel der Prothese gestaltet sich meist schwieriger (z.B. durch Verwachsungen) als die Erst-Operation.

Natürlich ist diese Entscheidung zur operativen Therapie individuell und meist abhängig von den Schmerzerfahrungen, die ein Patient äußert. Hier sei zu erwähnen, daß die Schmerzen nicht unbedingt konform zu den radiologischen Veränderungen sind. Es können ausgeprägte radiologische Veränderungen vorliegen (siehe Tab. 5), aber der Patient gibt kaum Schmerzen an.



**Abb.9:** Knie-TEP schematisch und radiologisch

([www.vincentius-krankenhaus.de](http://www.vincentius-krankenhaus.de))

Die Prinzipien zur Therapie der Arthrose lassen sich als Pyramide darstellen (Dieppe et al., 2005). Die Basis der Pyramide stellt das Informationsgespräch und die Aufklärung dar und dieses sollten deshalb alle Patienten mit Arthrose und Beschwerden erhalten. Die Spitze bilden die partielle und die totale Endoprothese, die heute immer häufiger erfolgt.

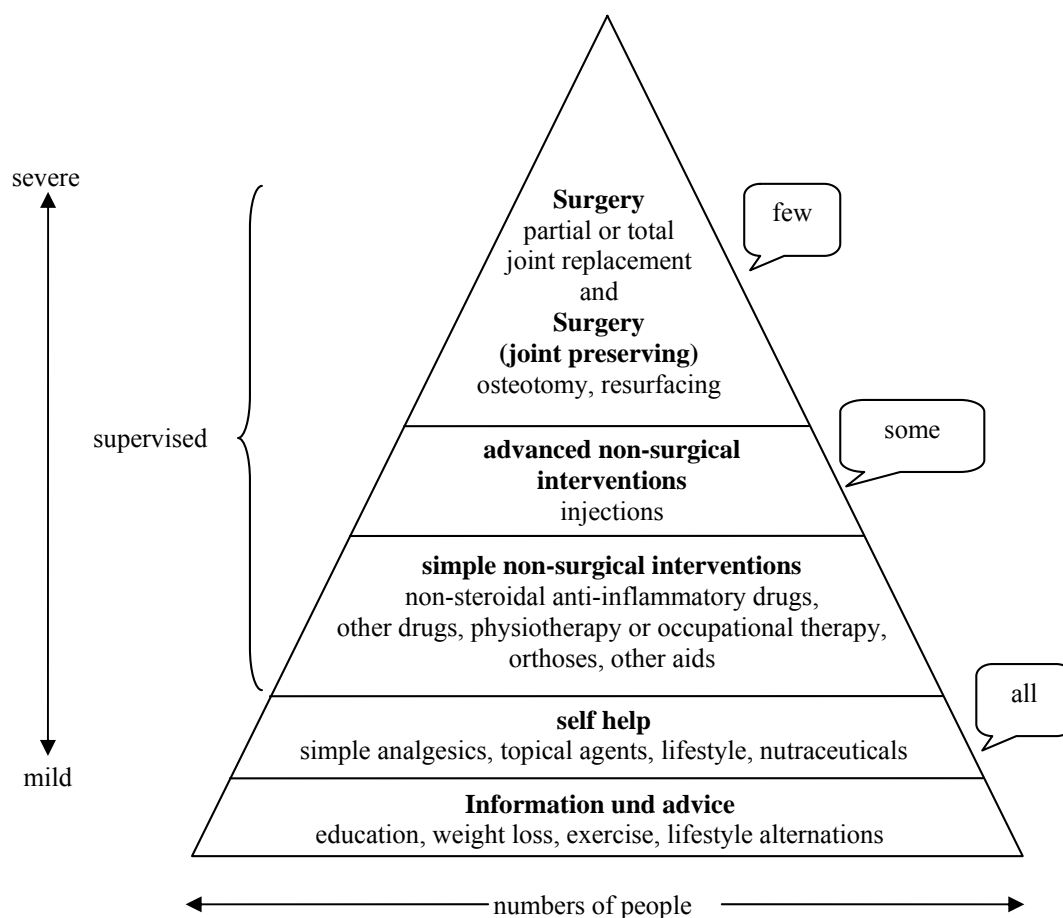


Abb.10: (Paul A Dieppe et al., Lancet 2005; 365:965-73)

Wie auch bei anderen Erkrankungen (z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen) ist die Prävention wichtig, d.h. es ist entscheidend einige der Hauptrisikofaktoren zu erkennen und so weit wie möglich zu reduzieren (z.B. Übergewicht, Fehlstellungen bei Verletzungen).

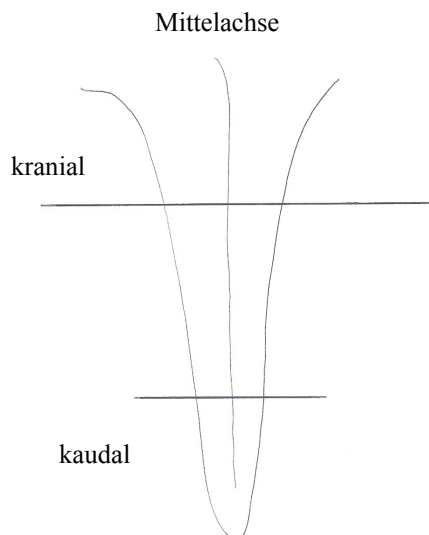
## 1.5 Sternum des Huhns



Abb. 11: Sternum eines 17 Tage alten Hühnerembryos

(Foto: Tobias Steens)

Die in den Versuchen verwendeten Chondrocyten werden aus embryonalen Hühnersterna gewonnen. Da die Entwicklung der Knorpelzellen im Hühnersternum lokalisiert ablaufen, kann man auf diese Weise die Chondrocyten eines definierten Differenzierungsstadiums leichter gewinnen, als wenn man sie aus der Wachstumsfuge isolieren würde. Zudem sind die nicht-hypertrophen Knorpelzellen im embryonalen Sternum metabolisch aktiver als die der adulten Tiere, wodurch sich der Nachweis von Proteinen als Marker für den Differenzierungszustand vereinfachen lässt (Alexandra



Babarina et al., 2001). Ab Tag 16 *in ovo* beginnen sich verschiedene Chondrocytenpopulationen im embryonalen Hühnersternum zu entwickeln. Ab diesem Tag beginnen sich im kranialen Teil des Sternums erste hypertrophe Chondrocyten zu bilden und ab Tag 17 findet man im kranialen Teil dann schon unterschiedlich differenzierte Knorpelzellen; peripher klein und proliferiert und beidseitig neben der Mittelachse hypertroph

(D'Angelo und Pacifici, 1997). Bis zum Tag 20 *in ovo* kommt es zur Gefäßinvasion mit perichondraler Ossifikation im kranialen Teil des Sternums (Gibson und Flint, 1985). Der kaudale Teil des Sternums verknöchert im Vergleich zum kranialen Teil erst später. Das erklärt, warum die kaudalen Chondrocyten des Sternum im Gegensatz zu den kranialen noch kein Kollagen X synthetisieren, während die kranialen Chondrocyten schon ab Tag 18 *in ovo* mit der Kollagen-X-Synthese beginnen (Gibson und Flint, 1985; Reginato et al., 1986).

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Chondrocyten-Spät differenzierung ist ein Prozeß, der unter physiologischen Bedingungen der enchondralen Ossifikation sowie der Knorpel degeneration zur Knochenbildung vorausgeht.

Unter pathologischen Bedingungen können ebenfalls Knorpel differenzierungsvorgänge vorkommen. Markerproteine für den differenzierten Zellzustand wurden in Gelenkknorpeln bei der Bildung einer Arthrose, einer der häufigsten Erkrankungen im Alter die zur Degeneration des Gelenkknorpels führen, nachgewiesen (Kirsch et al., 2000; Pullig et al., 2000; Von der Mark et al., 1992)

Die Ursache für diese Erkrankung läßt sich in vielen Fällen leider nicht ermitteln, aus diesem Grund wird sie auch als ideopathisch eingeordnet. Einer Hypothese zufolge findet eine unerwünschte Knorpel differenzierung, die zur Knorpel degeneration führt, im Gelenkknorpel statt.

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß am Modell des embryonalen Hühnersternums die Chondrocyten-Spät differenzierung durch mehrere lösliche Faktoren unterstützt werden kann. Hierbei ist zu erwähnen, daß Spät differenzierung bei den kranialen Knorpelzellen leichter einzuleiten ist. Die kranialen Zellen können den hypertrophen Zustand durch Einfluß von Thyroxin, Insulin oder IGF-I erreichen.

Bei den kaudalen Zellen des embryonalen Hühnersternums ist eine Spät differenzierung nur bei Kokultivierung mit Endothelzellmedium oder verschiedenen Proteasen und gleichzeitiger Gegenwart von Thyroxin zu beobachten (Bittner et al., 1998).

Wie schon erwähnt, können kaudale Chondrocyten ihre eigene Spät differenzierung durch lösliche Faktoren hemmen (Böhme et al., 1995). Zum Beispiel kommt es unter

Einfluß von Indian Hedgehog (Ihh) zu einer Differenzierung von Ruhechondrocyten zu proliferative Chondrocyten. Die weitere hypertrophe Entwicklung der Chondrocyten wird durch PTHrP inhibiert. Ihh und PTHrP interagieren dabei in einem negativem „feedback loop“, da Ihh die PTHrP-Synthese reguliert (Vortkamp, 2001; Vortkamp et al., 1996).

Der Einfluß der Proteasen könnte darin bestehen, daß sie diese Faktoren oder deren Rezeptoren so modifizieren oder abbauen, daß sie ihre Funktion verlieren und die negative Regulierung aufgehoben wird.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Läßt sich in kaudalen und kranialen Chondrocyten durch Kultur mit Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten eine Hypertrophie hervorrufen?
2. Wenn der hypertrophe Zustand durch Anwesenheit von Synovialflüssigkeit in vitro erreicht werden kann, welche löslichen Faktoren in den Arthrose-Synovialflüssigkeiten sind für die Hypertrophie verantwortlich.
3. Mit welchen Faktoren läßt sich eine Spätdifferenzierung der kranialen Chondrocyten in Kulturen mit Synovialflüssigkeiten verhindern?



## **Kapitel 2**

## **Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 *Chondrocyten***

##### **2.1.1.1 Präparation der Sterna**

Von 17 Tage alten Hühnerembryonen wurden zunächst unter sterilen Bedingungen die Sterna präpariert, vom Perichondrium befreit und 3x in Krebspuffer gewaschen. Die gewonnenen Sterna wurden dann in kaudale, kraniale und mittlere Stücke zu je einem Drittel zerteilt.

##### **2.1.1.2 Verdau der Sterna**

Wie in Barbarina et al., 2001 beschrieben wurden die Sternateile getrennt voneinander für den Verdau in Kollagenaselösung bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kollagenaselösung setzte sich aus 1mg/ml Kollagenase B in DMEM mit 1mM Cystein zusammen. Auf eine Schale mit 7ml Kollagenaselösung kamen ca. 100 Sternastücke.

##### **2.1.1.3 Präparation der Zell-Suspension**

Am nächsten Tag wurden die Zellen im Verdauansatz suspendiert und durch einen Swinex-Filter mit 3 Lagen Nylonmembran, mit einer Porengröße von 100µm in 50ml Röhrchen filtriert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit 40ml DMEM ohne Calcium und Phenolrot gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen jeweils bei 600 x g, 7min, RT abzentrifugiert. Die Zell-Pellets wurden in DMEM aufgenommen. Für das Zählen der Zellen wurden jeweils 20µl der Zellsuspension mit 80µl DMEM (ohne Calcium) versetzt (Verdünnung 1:5), von diesen 100µl wurden dann jeweils 20µl abgenommen und mit 20µl Trypanblau versetzt (Verdünnung 1:2). Mit diesen 40µl

wurden Neubauer-Zählkammern gefüllt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Zellzahlbestimmung in Trypanblau = Zellzahl x Verdünnung (1:10) x Faktor der Kammer (10.000) = Zellzahl/ml.

#### 2.1.1.4 Vorbereitung der beschichteten Schalen

Die Schalen mit einem Durchmesser von 35mm wurden mit 0,7ml 1% high melting Agarose in A.dest. (autoklaviert) beschichtet.

#### 2.1.1.5 Agarose-Suspensionskultur

(modifiziert nach Benya und Shaffer (1982))

Zur Herstellung von 0,7ml Agarose-Zell-Suspension wurden folgende Bestandteile verwendet:

Zellsuspension	350µl (Zellzahl 1.500.000)
2-fach DMEM	175µl
Low melt Agarose 2%	175µl
Zusätze BCP (200 fache Stammlösung)	3,5µl

Zunächst wurden das 2-fach DMEM mit Zusätzen und die Agaroselösung miteinander gemischt. Nach dem leichten Abkühlen dieser Lösung wurde anschließend die Zellsuspension dazugegeben, so daß eine Agarose-Zellsuspension mit  $2,14 \times 1.000.000$  Zellen/ml in 0,5%-Agarose mit 60µg/ml  $\beta$ -Aminopropionitril, 1mM Cystein und 1mM Pyruvat in DMEM entstand.

In die mit high melting Agarose vorbeschichteten Schalen wurden pro Schale 0,7ml Agarose-Zell-Suspension supplementiert. Die Schalen kamen dann für 15 Minuten auf eine Heizplatte, um die Zellen auf die untere zellfreie Agaroseschicht sedimentieren zu lassen. Danach wurden die Schalen für 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt, damit die Agarose fest wurde.

#### 2.1.1.6 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurde jeweils 1ml Medium und Zusätze (25µg/ml Ascorbinsäure, 60µg/ml β-Aminopropionitril, 1mM Cystein und 1mM Pyruvat) in die beschichteten Schalen gegeben.

Medienwechsel fand alle 2-3 Tage statt, die Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert.

Nach einer Kulturdauer von 14 bzw. 21 Tagen wurde den Kulturen <sup>14</sup>C-Prolin (1µCi/ml) zum frischen Medium (DMEM+Zusätze) dazugegeben, um die Zellen für 24 Stunden metabolisch zu markieren.

### 2.1.2 *Synovialflüssigkeit*

#### 2.1.2.1 Synovialflüssigkeit

Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Gonarthrose im Spätstadium wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Thomas Pap, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der WWU Münster zur Verfügung gestellt.

Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Knie Traumata wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Susanne Grässel, Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2.2 Herstellung des Synovial-Mediums

Die Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Gonarthrose im Spätstadium wurden mit DMEM in sterilen Schott-Gefäßen verdünnt. Je nach Menge der Synovialflüssigkeit und dem benötigten Medium wurde die Synovialflüssigkeit mit DMEM auf 1:9 bis 1:5 verdünnt.

Die Synovialflüssigkeiten von den Patienten mit Knie Traumata wurden nicht verdünnt

### **2.1.3**      *Endothelzellen*

Primärkulturen von isolierten Schweineaorten-Endothelzellen wurden freundlicherweise von Dr. Peter Vischer, Institut für Arterioskleroseforschung, Münster zur Verfügung gestellt. Die Isolation der Endothelzellen erfolgte wie in Vischer und Buddecke (1985) beschrieben.

Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung mit Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale gelöst, dann bei 300 x g, 5 min, RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in frisches DMEM + 10% FKS aufgenommen und die Zellen nach Verdünnung subkultiviert.

#### 2.1.3.1      Herstellung konditionierter Medien

Zur Herstellung von konditionierten Medien wurden Endothelzellen bis zur Konfluenz kultiviert. Dies war in der Regel nach 72-96 Stunden der Fall. Für eine längere Lagerung wurde das gesammelte Kulturmedium bei -20°C und für eine kurze Lagerung bei 4°C aufbewahrt.

Für die Herstellung von serumfreiem, konditioniertem Medium wurden die konfluenten Endothelzellen 2-3 mal mit PBS gewaschen und 24-48 Stunden in DMEM ohne Serum kultiviert. Für eine längere Lagerung wurde das gesammelte konditionierte Kulturmedium bei -20°C und für eine kurze Lagerung bei 4°C aufbewahrt. Vor Benutzung bei Experimenten wurde das Medium sterilfiltriert.

## **2.2**      **Kollagenpräparation**

### **2.2.1**      *aus Agarose*

(modifiziert nach Benya und Shaffer (1982))

Die bei -20°C eingefrorenen Kulturschalen mit Agarose und Medium wurden bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und das Medium sowie die obere Agaroseschicht in JA 20.1 Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde für den Pepsinverdau 5ml

Pepsinlösung (1mg/ml Pepsin in 0,5M Essigsäure/ 0,2M NaCl) dazugegeben und das Gemisch mit der Pepsinlösung für 72 Stunden bei 4°C gerührt.

Zur Neutralisation wurden den Ansätzen je 500µl Tris (ungepuffert) und 10M NaOH bis zum Farbumschlag hinzugefügt. Damit wurde der Pepsinverdau beendet und die Ansätze auf pH 7,4 gebracht. Durch Zugabe von festem NaCl (15,5 mg/ml) wurde die Salzkonzentration auf 1M erhöht. Die Ansätze wurden zur Extraktion der Kollagene weitere 24 Stunden bei 4°C gerührt.

Durch Zentrifugation (15000 rpm, 30 min, 4°C) wurde die Agarose vom restlichen Ansatz getrennt und der Überstand jedes Ansatzes in ein frisches JA 20.1 Röhrchen überführt. Die Kollagene wurden mit 200mg/ml NaCl ( Endkonzentration 4,5M ) bei 4°C über Nacht gerührt und damit gefällt. Die Ansätze wurden erneut zentrifugiert (18000 rpm, 45 min, 4°C) und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 300µl Storage Puffer (0,4M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 7,4) aufgenommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit 900µl eiskaltem 96% Ethanol mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Es wurde erneut zentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 300µl A.dest. aufgenommen, nochmals mit 900µl eiskaltem 96% Ethanol mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt und abzentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4°C). Das, nach Absaugen des Überstands, jeweils zurückgebliebene Kollagenpellet wurde getrocknet, in 70µl Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C fünf Minuten lang gekocht.

### **2.2.2**      *aus Kulturmedien*

Das Kulturmedium wurde abgenommen (1ml) und zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4°C), um grobe Ausfällungen im Medium zu entfernen. Die Proben wurden nach der Zentrifugation in neue Eppendorf-Gefäße überführt und pro Probe 100µl Pepsinlösung (10 mg/ml Pepsin in 1M HCl) zugegeben. Anschließend wurden die Proben mit der Pepsinlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Neutralisation wurden den Ansätzen je 70µl 1M Tris (ungepuffert) hinzugefügt. Mit 1M NaOH oder 1M HCl wurde der pH auf 7,4 eingestellt.

Durch Zugabe von festem NaCl (Endkonzentration 4,5M) und Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Kollagene gefällt und am nächsten Tag abzentrifugiert (14000 rpm,

30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100µl A. dest aufgenommen und mit 300µl eiskaltem 96% Ethanol mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation der Ansätze (14000 rpm, 30 min, 4°C), sowie Absaugen des Überstands, wurde das jeweils entstandene Kollagenpellet getrocknet, in 70µl Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C fünf Minuten lang gekocht.

Um zu gewährleisten, daß jeweils die gleiche Menge an radioaktiv makierten Kollagenen aufgetragen wurde, wurde die Radioaktivität in den Proben bestimmt. Dazu wurden 2µl der Probe in 100µl A.dest. in Scintillationsröhrchen gelöst und mit 2ml Scintillationsflüssigkeit Lumasafe Plus versetzt. Die cpm-Werte wurden mit einem  $\beta$ -counter (Beckmann) bestimmt. Es wurden 1000-1500 cpm pro Bahn aufgetragen.

## **2.3 SDS-PAGE**

Zur Auftrennung der Kollagene wurde ein Gel mit einem Acryl/Bisacrylamid-Gradienten von 4,5-15% (Sammelgel 4,5%) gegossen. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE sind in Laemmli (1970) beschrieben. Abweichend dazu wurde folgender Probenpuffer verwendet: 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 mit 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,8 M Harnstoff, 0,001% (w/v) Bromphenolblau. Das in diesem Probenpuffer verwendete Reduktionsmittel war 3% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel mit 0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250 in 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure gefärbt und zunächst mit 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, und anschließend mit 10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

### **2.3.1 *Fluorographie***

Für die Fluorographie wurden die Gele 3 mal 20 Minuten in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert und mindestens 3 Stunden in 20% (w/v) Diphenyloxazol in DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Gele 45 Minuten in A.dest. gewässert und im Geltdrockner (Biorad) getrocknet. Zur Detektion wurden Röntgenfilme bei -80°C 7 bis 21 Tage auf den Gelen exponiert.

## 2.4 T4-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Zur Bestimmung des T4-Gehalts in Synovialflüssigkeiten und Medienüberständen der Zellkulturen wurde ein ELISA der Firma Diagnostic Systems Laboratories, Inc. nach Angaben des Herstellers verwendet.

Vor Verwendung der Proben und Reagenzien wurden diese auf Raumtemperatur (ca. 25°C) gebracht. Standards, Kontrollen und Proben wurden als Doppelprobe analysiert.

Die verwendeten Mikrotiterplatten wurden markiert und jeweils 25µl Standard, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert.

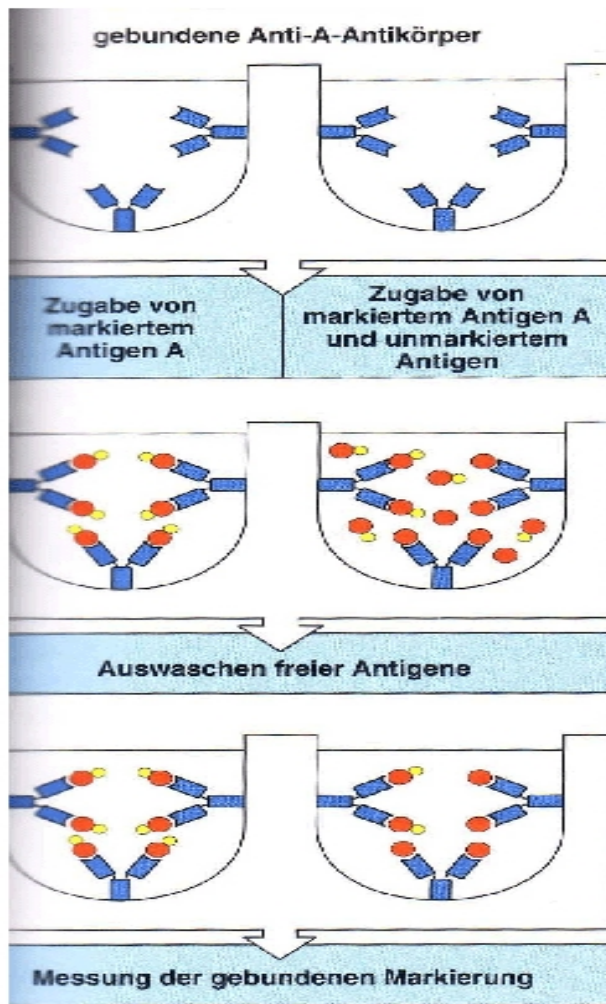


Abb. 12. Schematische Darstellung eines kompetitiven ELISA-Tests

Anschließend wurde mit einem halbautomatischen Dispenser in jede Vertiefung 100µl T4-Enzymkonjugat-Lösung gegeben und 5-10 Sekunden leicht gegen den Mikrotiterstreifenhalter geklopft.

Dann wurde in jede Vertiefung 100µl T4-Antikörper pipettiert, die Vertiefungen abgedeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Horizontalschüttler bei ca. 350-400 rpm inkubiert.

Nach der Stunde wurden alle Vertiefungen jeweils fünfmal gewaschen und die Platte durch Umkehr auf eine saugfähige Unterlage trocken geklopft.

Nach dem Waschen und Trocken wurde in jede Vertiefung 100µl TMB-Chromogen-Solution gegeben, die Vertiefungen abgedeckt und 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Horizontalschüttler bei 350-400 rpm inkubiert.

Zum Beenden der Inkubation wurde 100µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung gegeben und innerhalb von 30 Minuten wurde mit einem auf 450 nm eingestellten Mikrotiterplatten-Reader die Absorption der Lösung in den Vertiefungen gemessen.

## **2.5 Immunoblot**

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden elektrophoretisch getrennt und mittels Elektrotransfer (Nassblot) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (3 Stunden, 30 V, 80-180 mA je nach Gelgröße). Der hierfür verwendete Transfer-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 50mM Tris, 380 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol.

Zunächst wurde die Membran mit TBS +0,05% Tween (TBS-T) gewaschen und in 5% entrahmtem Milchpulver, 1% BSA in TBS-T mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsplätze zu blockieren. Nach kurzer Spülung mit TBS-T wurde mit dem 1. Antikörper in Verdünnungspuffer (2,5% entrahmtes Milchpulver, 0,5% BSA in TBS-T) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Inkubation mit dem 2. Antikörper (POD-konjugiert) in Verdünnungspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte nach dreimaliger Waschung à 15 Minuten mit TBS-T. Anschließend wurden die Blots erneut gewaschen (3x15 Minuten mit TBS-T) und mit Detektionsreagenz entwickelt. Das Detektionsreagenz setzt sich aus A. 250mM Luminol (Fluka 09253) in DMSO; B. 90 mM p-Coumarsiure (Fluka 28200) in DMSO; C. 1M Tris-Cl pH 8,5; D. 30%-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zusammen. Dafür mischte man 200µl



der Lösung A mit 89µl der Lösung B und 2µl der Lösung C, dann füllte man mit Wasser auf 20ml auf. Das entgültige Detektionsreagenz entstand nach Zugabe von 6,1 µl der Lösung D.

Auf einem Röntgenfilm wurde dann die Chemilumineszenz registriert.

## **2.6 Zymographie**

### **2.6.1 *Gelatine-Substrat-Zymographie***

Zum Nachweis von Gelatinasen im Kulturmedium erfolgte eine Gelatine-Substrat-Zymographie. Der Trenngellösung eines Gradientengels (4,5-15% Acryl/Bisacrylamid, Sammelgel 4,5%) wurde 0,1% Gelatine hinzugefügt. Die zu testenden Kulturmedien wurden mit dem gleichen Volumen eines 2fachen Probenpuffers versetzt (20mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 2mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) und die Proteine per Elektrophorese getrennt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in 2,5% Triton X-100 2 x 30 Minuten gewaschen, mit A.dest 4 x 5 Minuten gespült und danach über Nacht bei 37°C in 50mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 inkubiert.

Die Färbung des Gels erfolgte wie bereits in 2.3 beschrieben. Helle Banden zeigten proteolytische Aktivität an.

### **2.6.2 *Casein-Substrat-Zymographie***

Für den Nachweis caseinolytischer Enzyme erfolgte eine Casein-Substrat-Zymographie. Hierbei wird der Trenngellösung eines Gradientengels (4,5-15% Acryl/Bisacrylamid) festes 2mg/ml β-Casein hinzugefügt. Das Trenngel wurde dann solange gemixt, bis sich das Casein komplett gelöst hatte.

Das weitere Verfahren unterscheidet sich nicht von der Gelatine-Substrat-Zymographie und ist in 2.6.1 beschrieben.

## **2.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase**

(modifiziert nach Bessey et al. (1946))

Für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase wurden 50µl Kulturmedium mit 450µl Reaktionslösung (0,2% p-Nitrophenylphosphat in 1M Diethanolamin-HCl, pH 9,8) über 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der halben Stunde wurde die Reaktion mit 500µl Stopplösung (2M NaOH, 0,2mM EDTA) beendet und die Extinktion bei 405nm bestimmt.

## **2.8 Bestimmung der sauren Phosphatase**

Die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase glich im Ablauf der Bestimmung der alkalischen Phosphatase, nur daß die Reaktionslösung sich wie folgt zusammensetzte; 0,2% p-Nitrophenylphosphat in 0,2M Na-Acetatpuffer, pH 5,0.

## **2.9 Verwendete Lösungen und Reagenzien**

Krebs-Ringer-Puffer

15,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 111,2 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 13 mM Glucose, pH 7,4

DMEM (4,5g/ml Glucose), Gibco

Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell

Penicillin/Streptomycin 100x, Gibco

PBS (ohne Ca, Mg) 10x, Gibco

Trypsin-EDTA für Endothelzellen, Sigma

Kollagenase B, Boehringer Mannheim

Ascorbinsäure, Merck

β-Aminopropionitril, Sigma

L-Cysteinhydrochlorid, Sigma

Natriumpyruvat, Merck

Nieder- und Hochtemperaturagarose, FMC BioProducts  
L-Thyroxine, Fluka  
Insulin  
IGF-I  
DSL-10-3200 ACTIVE T4 Enzyme Immunoassay-Kit  
Chymotrypsin, Serva  
<sup>14</sup>C-Prolin, NEN  
E 64  
MMP-3 Inhibitor II, Calbiochem  
o-Phenanthrolin  
EDTA  
Leupeptin  
Pepstatin  
Pepsin, Serva  
Aprotinin, Sigma  
Gelatine, Sigma  
β-Casein, Sigma  
Alkalische Phosphatase Substrat 104, p-Nitrophenylphosphat, Sigma  
Rabbit anti-RP1 MMP-13, polyklonaler Antikörper gegen MMP-13  
Detektionsreagenz  
Lumasafe Plus, Lumac-LSC

### **3.1 Einfluß von late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit auf die Spätdifferenzierung von Hühner-Chondrocyten**

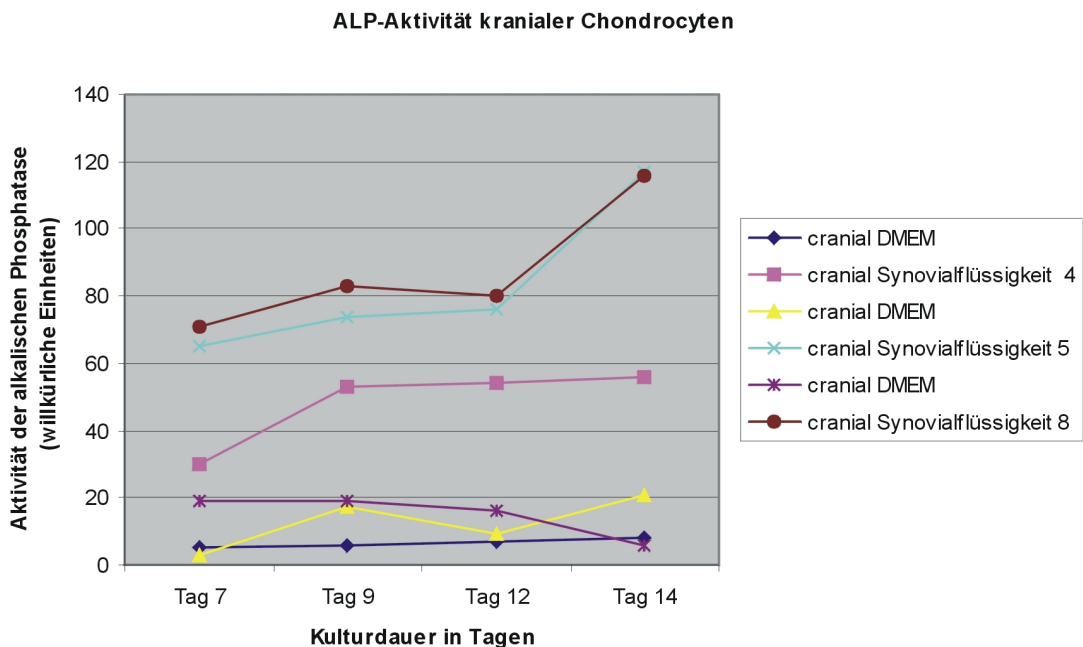
Die Zelldifferenzierung im Knorpelgewebe ist eine Kaskade von Ereignissen, die mit Mesenchymzellen beginnt und in hypertrophen Knorpelzellen gipfeln kann. Der hypertrophe Zustand der Chondrocyten wird physiologischerweise während der enchondralen Ossifikation erreicht, also während der Knochenentwicklung und Knochenreparatur. In permanentem Knorpel, wie er auf Gelenkoberflächen zu finden ist, findet diese terminale Differenzierung normalerweise nicht statt. Aber unter pathologischen Bedingungen können auch diese Ruhechondrocyten in einen hypertrophen Zustand mit einer hohen metabolischen Aktivität differenzieren. Dieser Prozess ist häufig auch bei Osteoarthrose zu beobachten (Sokoloff, 1979; Von der Mark, 1992).

Jede dieser Differenzierungsstufen hat charakteristische Komponenten in der extrazellulären Matrix (Cancedda et al., 1995), mit denen der jeweilige Differenzierungsgrad unterschieden werden kann. Während der Proliferation (Differenzierungsstufe I) sezernieren die Knorpelzellen Kollagen II, IX und XI, Aggrecan und Verbindungsproteine. Der Wechsel in die Differenzierungsstufe II ist dadurch gekennzeichnet, daß die Knorpelzellen hypertrophieren und Kollagen X sowie alkalische Phosphatase bilden (Cancedda et al., 1995). Die letzte Differenzierungsstufe ist durch einspritzende Blutgefäße in den hypertrophen Knorpel charakterisiert, was ein Absterben der Chondrocyten durch Apoptose oder deren Umwandlung zu Osteoblasten ähnlichen Zellen zur Folge hat (Descalzi-Cancedda et al., 1992; Roach et al., 1995). Für die Versuchansätze wurden Chondrocyten aus dem Sternum eines 17 Tage alten Hühnerembryos gewonnen, die sich aufgrund der anatomischen Struktur des Sternums in kraniale und kaudale Chondrocyten unterteilen lassen (siehe Kapitel 1.5).

### 3.1.1 *Kraniale Chondrocyten*

Um zu zeigen, ob die Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten eine Hypertrophie auslöst, wurden in den ersten Versuchsreihen kraniale Chondrocyten über einen Zeitraum von 14 Tagen in Agarose zusammen mit entsprechender Synovialflüssigkeit verdünnt in DMEM kultiviert. Die Synovialflüssigkeiten, die für die Versuche genutzt wurden, sind für jeden Versuch von einem anderen Patienten entnommen worden. Als Marker für eine mögliche Hypertrophie wurde die alkalische Phosphataseaktivität (ALP) und Kollagen X (Schmid and Conrad, 1982; Schmid and Linsenmayer, 1985) bestimmt. In den Kontrollkulturen wurden die kranialen Chondrocyten in Agarose mit DMEM kultiviert.

Abbildung 14 zeigt eine deutliche Aktivitätsdifferenz zwischen den Versuchsansätzen mit Synovialflüssigkeit und denen mit DMEM kultivierten Chondrocyten. In den Kulturen mit Synovialflüssigkeit ist eine deutlich erhöhte Aktivität der ALP sichtbar, während die Aktivität der ALP in den Proben, die mit DMEM kultiviert wurden, nicht anstieg.



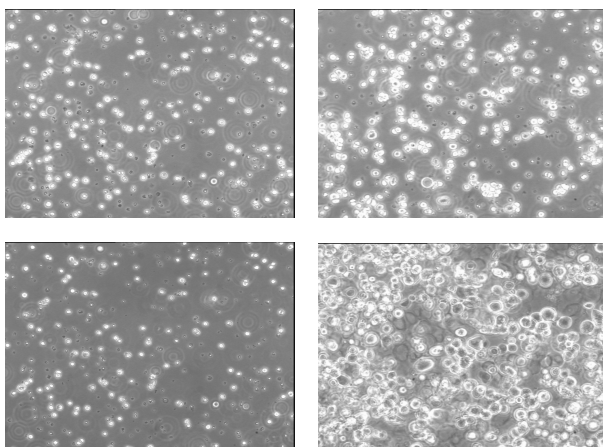
**Abb. 14. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten**  
Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt kultiviert.

Es wurden jeden 2. Tag beim Wechsel des Mediums Photos der Zellen am Mikroskop angefertigt, die einen optischen Vergleich zu vorherigen Tagen sowie eine Korrelation zu den Hypertrophie-Markern ermöglichen.

Wie in Abbildung 15 erkennbar, existiert in der Probe, die mit 1ml DMEM kultiviert wurde (linke Seite) zwischen Tag 2 und Tag 14 der Kulturdauer kein signifikanter Unterschied. Hier sei noch anzumerken, daß die Zellzahl der Probe mit DMEM von Tag 2 auf Tag 14 um ca. 21% abgenommen hat, was für einen Untergang der Chondrocyten während der Kulturdauer spricht.

Weiterhin ist auf der rechten Seite der Abbildung 15 die Probe zu sehen, die mit 1ml Synovialflüssigkeit 4 verdünnt in Medium kultiviert wurde.

Gut sichtbar sind hier die Veränderungen der Chondrocyten zwischen Tag 2 und Tag 14 des Versuchs. Während am Tag 2 des Versuchs die Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit im Medium kultiviert wurden, nur gering vergrößert erscheinen gegenüber den Chondrocyten, die mit DMEM kultiviert wurden, ist am Tag 14 des Versuchs ein deutlicher Unterschied zu sehen. Die Chondrocyten mit Synovialflüssigkeit im Medium sind zwischen Tag 2 und Tag 14 nicht nur proliferiert, sondern auch hypertrophiert. Die Zellzahl ist um ca. 82% gestiegen und es hat sich eine gut erkennbare extrazelluläre Matrix gebildet, die sich wie ein Halo um die Chondrocyten gelegt hat.



**Abb.15. Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 4**

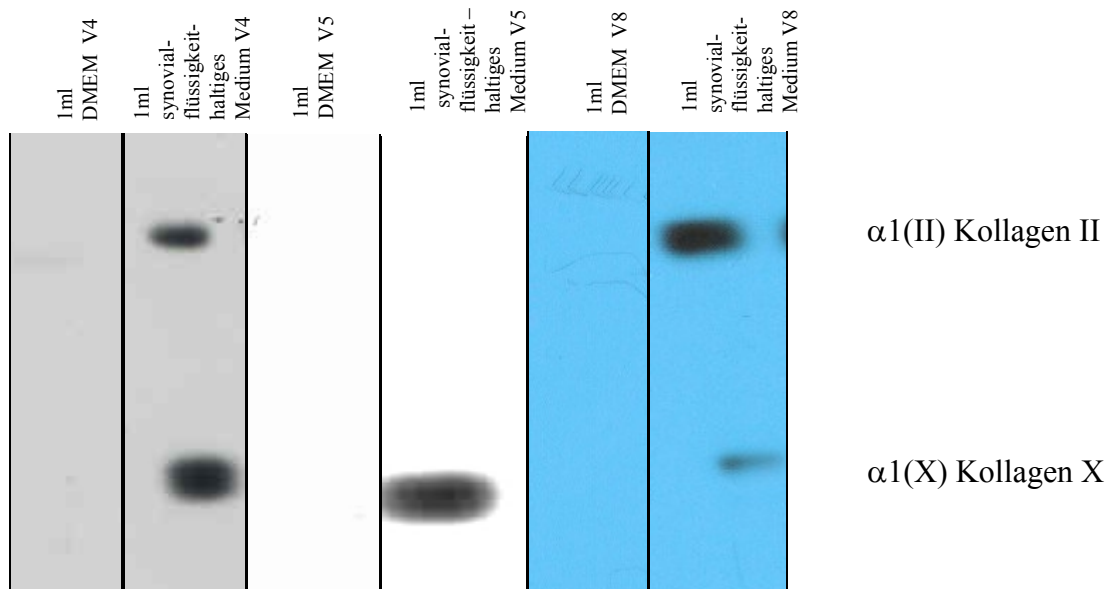
Li. oben: Kultur mit DMEM am Tag 2 Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 2  
Li. unten: Kultur mit DMEM am Tag 14 Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 14

Die Veränderungen der Morphologie der Zellen spiegeln, wie die der ALP-Aktivität (Abbildung 14), den hypertrophen Zellzustand wider.

Einen weiteren Marker für die Hypertrophie von Chondrocyten stellt die Expression und Sekretion von Kollagen X dar (Cancedda et al., 1995; Solursh et al., 1986).

Um das Kollagen nachzuweisen, wurden die Chondrocyten nach einer Kultivierung von 14 Tagen mit  $^{14}\text{C}$ -Prolin radioaktiv markiert und die Kollagene aus dem Medium oder der Agarose extrahiert. Die nach Pepsinverdau gewonnen Kollagene wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und anschließend ein Fluorogramm erstellt. Für die folgenden Fluorogramme (Abbildung 16) wurden die Kollagene aus dem Medium extrahiert.

Die Fluorogramme für Versuch 4,5 und 8 (Abbildung 16) zeigen eine deutliche Bande für Kollagen X in den Proben der kranialen Chondrocyten, die mit synovialflüssigkeitshaltigem Medium kultiviert wurden. Auch die Kollagen-II-Bande sind in den Proben der Versuche 4 und 8 gut zu erkennen. Die Kollagen-II-Bande für die Proben mit den Chondrocyten, die mit DMEM kultiviert wurden, sind eher schwach bis nicht sichtbar und eine Bande für Kollagen X ist nicht erkennbar.



**Abb. 16. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 4,5 und 8 zum Nachweis von Kollagen X**

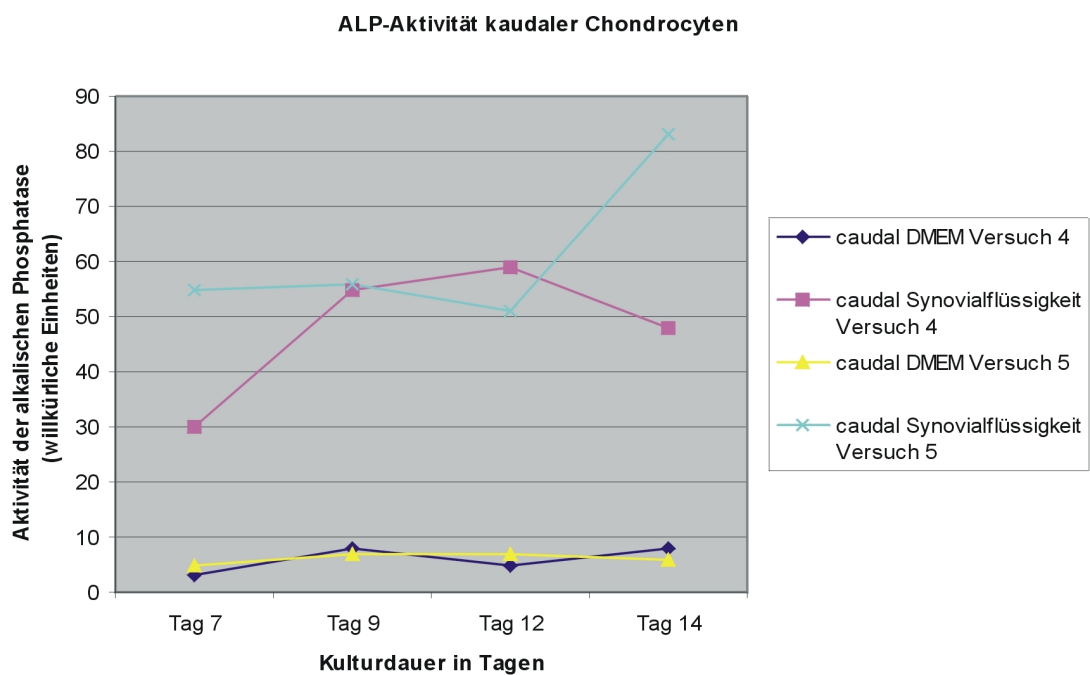
Li.: Probe, in der kraniale Chondrocyten mit 1 ml DMEM über 14 Tage kultiviert wurden

Re.: Probe, in der Chondrozyten mit 1 ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium über 14 Tage kultiviert wurden

### 3.1.2 Kaudale Chondrocyten

Die Ergebnisse der Experimente mit kaudalen Chondrocyten stellen sich anders dar. Wie auch schon bei den kranialen Chondrocyten wurden die kaudalen Zellen über 14 Tage zum einen mit DMEM und zum anderen mit synovialflüssigkeitshaltigem Medium kultiviert.

Die Bestimmung der Aktivität der ALP als Hypertrophiemarker für die Chondrocyten zeigt bei der Probe mit Synovialflüssigkeit eine deutliche Erhöhung der ALP-Aktivität im Vergleich zu der Probe mit DMEM. Diese Werte lassen vermuten, daß durch die Synovialflüssigkeit auch bei den kaudalen Chondrocyten eine Hypertrophie und damit eine Spätdifferenzierung ausgelöst wurde.

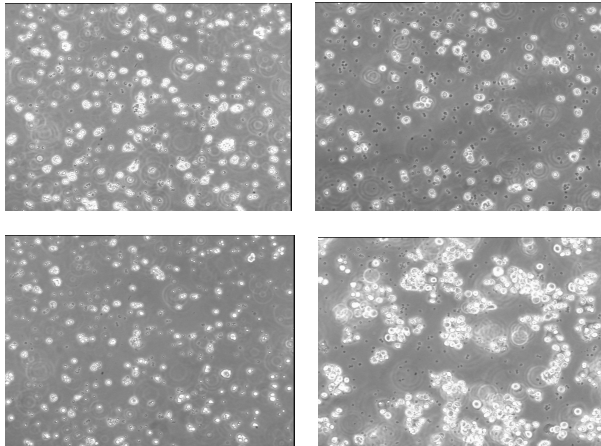


**Abb. 17. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt kultiviert.



Auch die Photos, die wie bei den kranialen Chondrocyten, jeden 2. Tag während der Kulturdauer am Photo-Mikroskop angefertigt wurden (Abbildung 18) zeigen in der Probe mit der Synovialflüssigkeit eine Proliferation der kaudalen Chondrocyten um ca. 200% zwischen Tag 2 und Tag 14 des Versuchs.



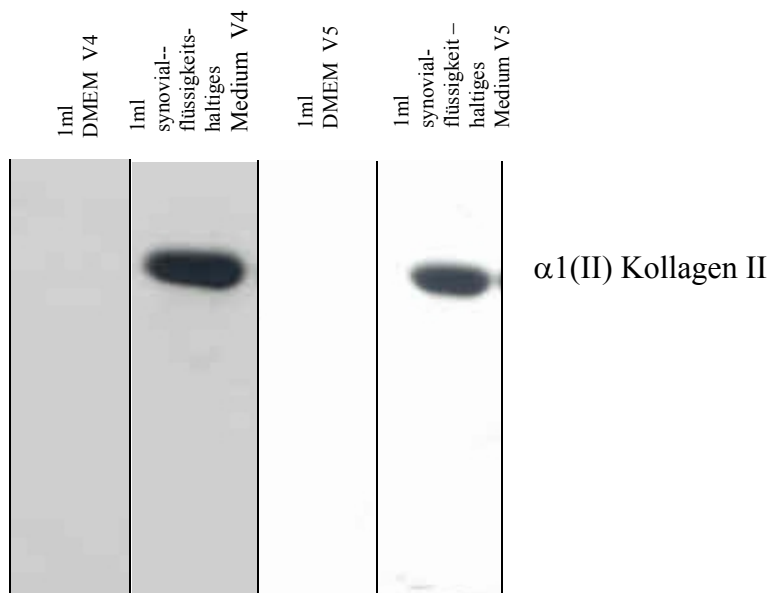
**Abb.18. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 4**

Li. oben: Kultur mit DMEM am Tag 2    Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM am Tag 14    Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 14

Betrachtet man hingegen die Ansätze mit DMEM und kaudalen Chondrocyten kommt es zu einer Abnahme der Zellzahl um ca. 31% zwischen Tag 2 und Tag 14 des Versuchs. Vergleicht man diese Aufnahmen allerdings mit denen der kranialen Chondrocyten (Abbildung 15), so zeigt sich, daß die Bildung der extrazellulären Matrix bei den kranialen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, viel ausgeprägter ist, als bei dem Versuchsansatz mit kaudalen Zellen. Bei den Proben mit DMEM nimmt die Zellzahl sowohl bei den kranialen als auch bei den kaudalen Chondrocyten ab.

Auch die mikroskopischen Aufnahmen der kaudalen Knorpelzellen sind konform zu der ALP-Aktivität (Abbildung 17).

Bei dem Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels der kaudalen Chondrocyten von Versuch 4 und 5 (Abbildung 19), zeigt sich bei den Proben mit Synovialflüssigkeit eine überaus deutliche Kollagen-II-Bande, die bei den Versuchsansätzen mit DMEM nur hauchzart zu erkennen ist. Kollagen X konnte bei beiden Versuchsansätzen nicht nachgewiesen werden, trotz erhöhter ALP-Aktivität und erkennbarer Proliferation der Zellen.



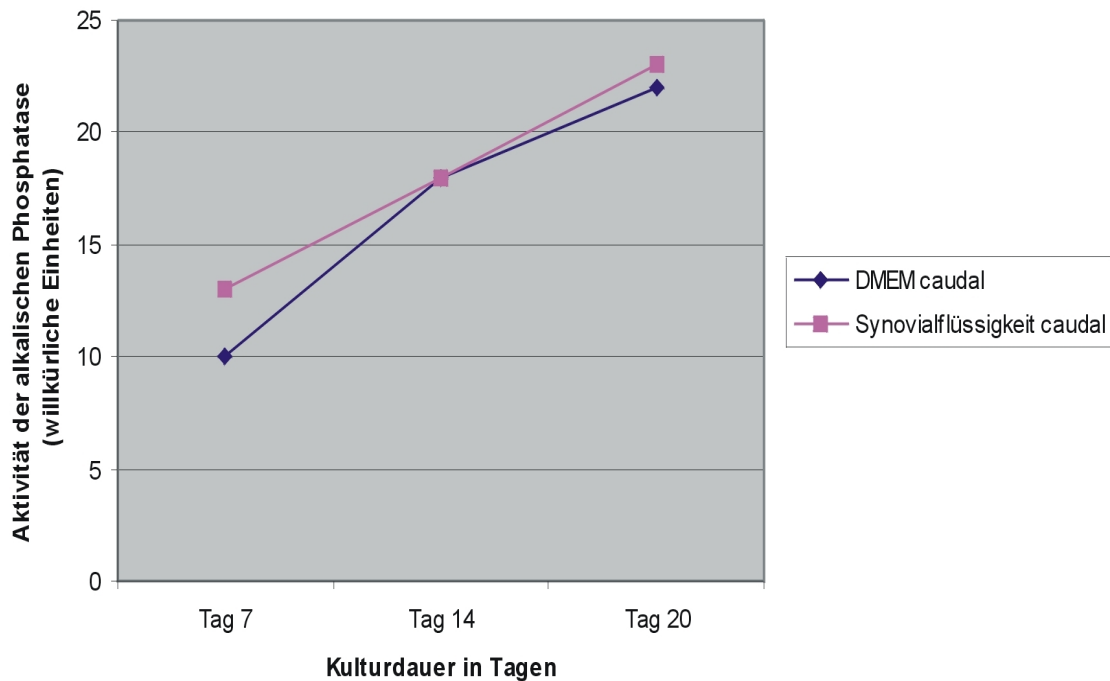
**Abb. 19. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 4 zum Nachweis von Kollagen X**  
 Li.: Probe, in der kaudale Chondrocyten mit 1ml DMEM über 14 Tage kultiviert wurde,  
 Re.: Probe, in der Chondrozyten mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium über 14 Tage kultiviert wurde

### 3.1.3 *Kaudale Chondrocyten mit einer Kulturdauer von 21 Tagen*

In den vorherigen Versuchen (Versuch 2, 4 und 5) mit kaudalen Chondrocyten und Synovialflüssigkeit zeigt sich immer eine deutliche Erhöhung der ALP-Aktivität gegenüber den Proben, die mit DMEM kultiviert wurden. Auch bei den mikroskopisch gefertigten Aufnahmen zeigt sich eine Proliferation sowie eine Vergrößerung der Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, gegenüber den Ansätzen mit DMEM. Dies ließ eine Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, vermuten, die sich in keinem der gefertigten Fluorogramme dieser Versuche (2, 4 und 5) bestätigen ließ, da die Kollagen-X-Banden gänzlich fehlten.

Die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen lassen vermuten, daß sich die kaudalen Chondrocyten in ihrer Differenzierung noch in einer frühen Phase befanden und eventuell in einer späteren Phase der Kultur Kollagen X bilden würden. Im folgenden Versuchsansatz wurden die Zellen deshalb über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert.

### ALP-Aktivität Versuch 6 kaudale Chondrocyten



**Abb. 20. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten.**

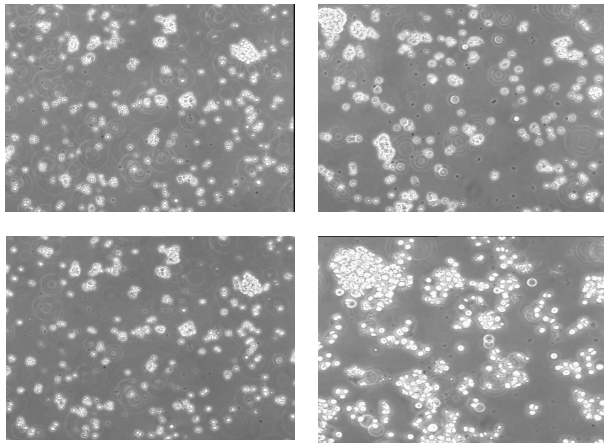
Die Zellen wurden 21 Tage zum einen mit DMEM und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt kultiviert.

Abbildung 20 zeigt, daß in diesem Versuchsansatz kaum ein Unterschied der ALP-Aktivitäten zwischen den Proben, die mit DMEM kultiviert wurden und den Proben die mit der Synovialflüssigkeit von Patient 6 kultiviert wurden, zu erkennen ist.

Betrachtet man hingegen die mikroskopischen Aufnahmen der Proben mit der Synovialflüssigkeit, sieht man auch hier, wie in den Versuchsansätzen zuvor, eine Proliferation der Chondrocyten, allerdings ohne ausgeprägte Produktion von extrazellulärer Matrix, die auf eine Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten schließen läßt (Abbildung 21, rechte Seite). Die Proben mit DMEM zeigen bis auf eine Abnahme der Zellzahl keine Veränderungen (Abbildung 21, linke Seite).

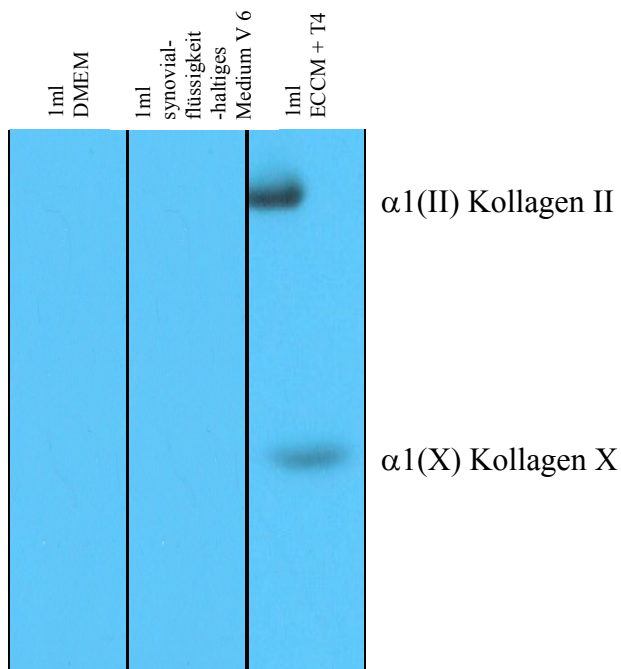
Das Fluorogramm dieses Versuchs (Abbildung 22) läßt sowohl bei den Proben mit Synovialflüssigkeit als auch bei den Proben mit DMEM keine Kollagen-X-Bande erkennen.

Zusätzlich zu den schon vorhandenen Proben wurden in Versuch 6 zwei Proben mit konditioniertem Endothelzellmedium und Thyroxin als Positivkontrolle kultiviert. Im Fluorogramm (Abbildung 22, rechte Seite) zeigte sich in beiden Proben eine Kollagen-II- und eine Kollagen-X-Bande.



**Abb.21. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 6**

Li. oben: Kultur mit DMEM am Tag 2    Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM am Tag 16    Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit am Tag 16



**Abb. 22. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 6 zum Nachweis von Kollagen X**

Li.: Probe, in der kaudale Chondrocyten mit 1ml DMEM über 21 Tage kultiviert wurden,  
 Mitte: Probe, in der Chondrozyten mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium über 21 Tage kultiviert wurden  
 Re.: Kontrollprobe mit 1ml ECCM + T4 nach einer Kulturdauer von 21 Tagen.

### 3.1.4 Zellproliferation von kranialen und kaudalen Chondrocyten unter Einfluß von late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten

Wie bei den vorherigen mikroskopischen Aufnahmen schon aufgefallen ist, kommt es zu einer Veränderung der Zellzahl in den Proben.

Es ist ein Unterschied sowohl zwischen kranialen und kaudalen Chondrocyten als auch zwischen den Proben mit DMEM und Synovialflüssigkeit sichtbar.

Wie Abbildung 23 darstellt, kommt es zu einer Zunahme der Zellzahl bei den Proben, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden. Von durchschnittlich 382 Zellen, steigt die Zellzahl auf durchschnittlich 543 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Die Zellzahl nimmt also um ca. 42% zu.

Betrachtet man hingegen die Zellzahl der Proben, die mit DMEM kultiviert wurden, ist eine Abnahme der Zellzahl erkennbar. Die Zellzahl sinkt nach 14 Tagen von anfänglich durchschnittlich 291 Zellen auf durchschnittlich 238 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Die Zellzahl nimmt also ca. um 18% ab.

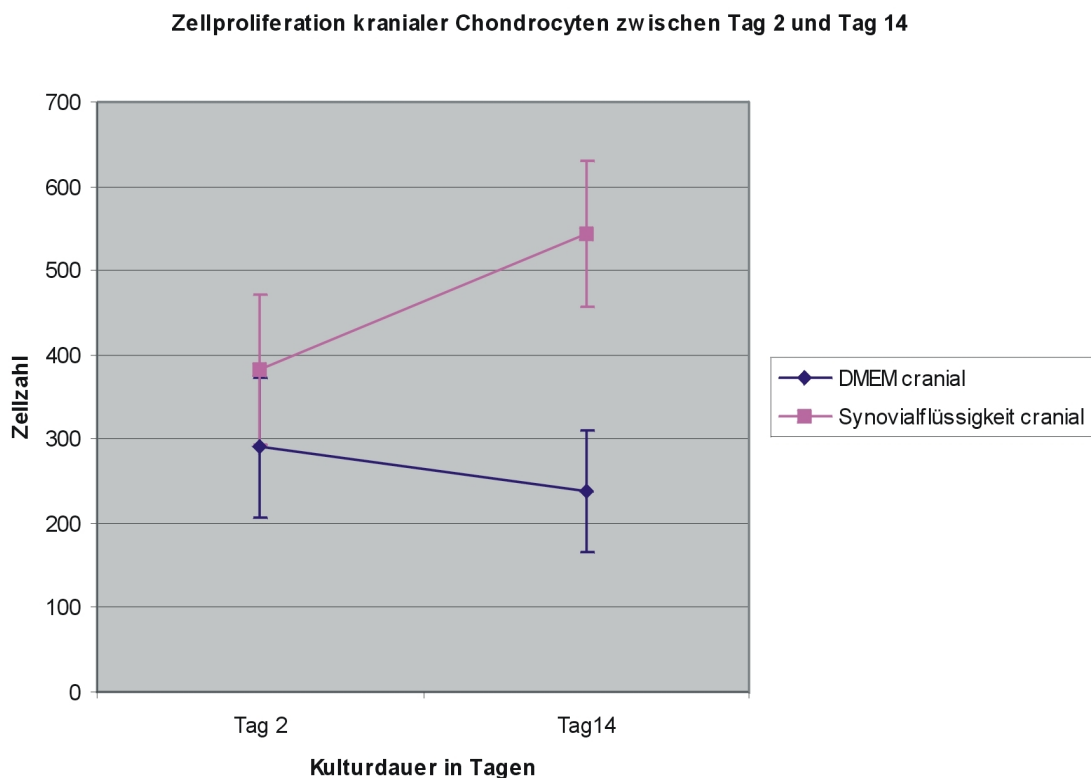


Abb. 23. Zellproliferation kranialer Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen

Die kranialen Chondrocyten in den synovialflüssigkeitshaltigen Proben bilden also nicht nur vermehrt extrazelluläre Matrix (Abbildung 15), die sich wie ein Halo um die Zellen legt, sie zeigen auch vermehrte proliferative Aktivität (Abbildung 15, 23).

Hierbei wurde die Zellproliferation von kranialen Zellen aus jeweils fünf Versuchansätzen mit DMEM und fünf Versuchansätzen mit Synovialflüssigkeit ausgezählt. Bei jedem Versuchansatz ist eine andere Synovialflüssigkeit verwendet worden.

Abbildung 24 zeigt die Proliferation der kaudalen Chondrocyten. Wie bei den kranialen Chondrocyten, die mit DMEM kultiviert wurden, ist auch bei den kaudalen Chondrocyten eine Abnahme der Zellzahl nach 14 Tagen Kulturdauer zu beobachten. Die Abnahme der Zellen bei den Proben von durchschnittlich 359 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt auf durchschnittlich 294 Zellen bedeutet eine Abnahme von ca. 18% und liegt damit ungefähr bei den Werten, die auch für die kranialen Zellen beobachtet wurden.

Die Werte für die kaudalen Zellen, die mit Synovialflüssigkeit über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert wurden stellen sich anders dar.

Am Tag 2 wurde eine Zellzahl von durchschnittlich 334 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt festgestellt. Am 14. Tag der Kulturdauer ist diese Zellzahl auf durchschnittlich 718 Zellen gestiegen, was eine Proliferation um 384 Zellen darstellt. Die Zellzahl nimmt bei den kaudalen Zellen also nach 14 Tagen Kulturdauer um ca. 115% zu.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die Proliferation bei den kaudalen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, ausgeprägter ist als bei den kranialen Chondrocyten-Proben, während bei den Proben, die mit DMEM kultiviert wurden sowohl bei den kranialen als auch bei den kaudalen Chondrocyten eine Abnahme der Zellzahl um ca. 18% zu sehen ist.

Hierbei wurde die Zellproliferation von kaudalen Zellen aus jeweils drei Versuchansätzen mit DMEM und drei Versuchansätzen mit Synovialflüssigkeit ausgezählt. Bei jedem Versuchansatz ist eine andere Synovialflüssigkeit verwendet worden.

### Zellproliferation kaudaler Chondrocyten zwischen Tag 2 und Tag 14

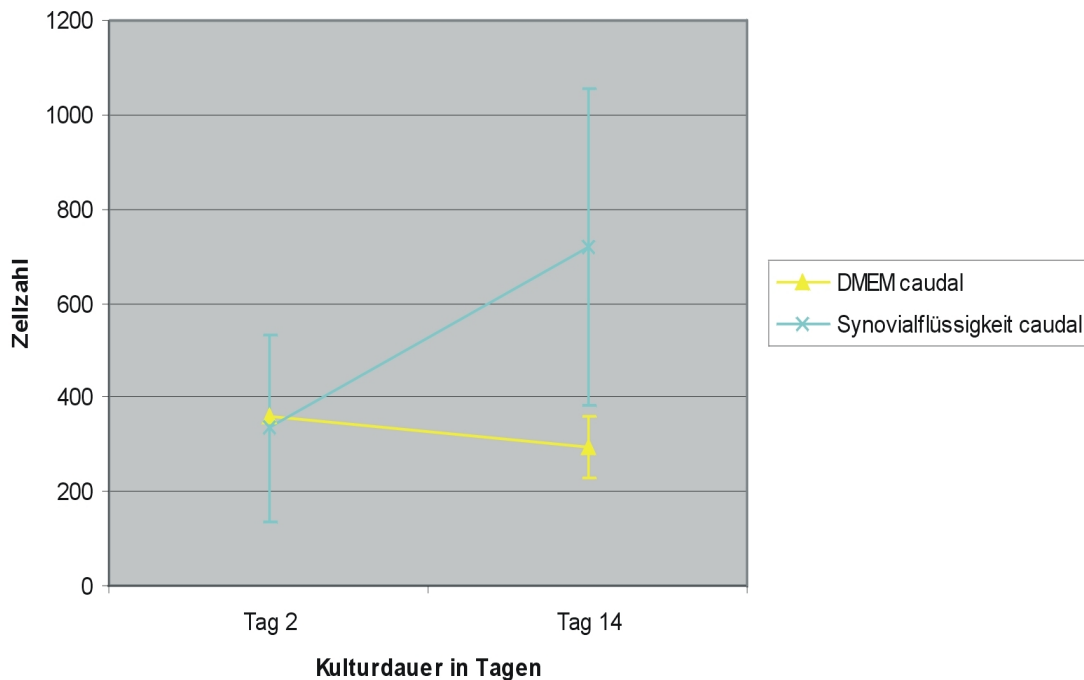


Abb. 24. Zellproliferation kaudaler Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen.

## 3.2 Einfluß verschiedener löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spätdifferenzierung in Kultur mit late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit

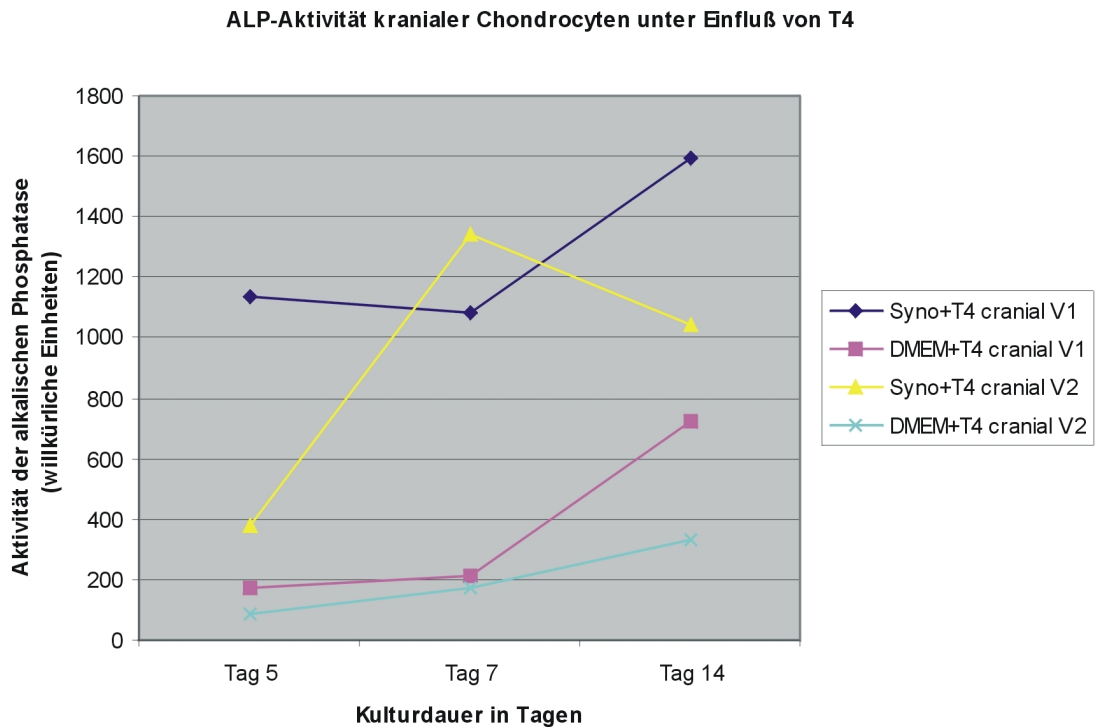
In diesem Kapitel wird der Einfluß verschiedener löslicher Faktoren auf die Spätdifferenzierung von kranialen und kaudalen Chondrocyten dargelegt. Zu den benutzten löslichen Faktoren zählen unter anderem T4, IGF-I, verschiedene Proteasen sowie Protease-Inhibitoren.

### 3.2.1 *Kraniale Chondrocyten*

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, löst die late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit bei den kranialen Hühner-Chondrocyten eine Hypertrophie aus. In diesem Kapitel soll dargelegt werden, ob bestimmte lösliche Faktoren das Auslösen der Spätdifferenzierung mit anschließender Hypertrophie beeinflussen können.

### 3.2.1.1 T4, Thyroxin

Es wurden jeweils Proben mit DMEM und T4 sowie Synovialflüssigkeit und T4 über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Es wurden 25ng T4 auf 1ml DMEM oder 1ml Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt gegeben.



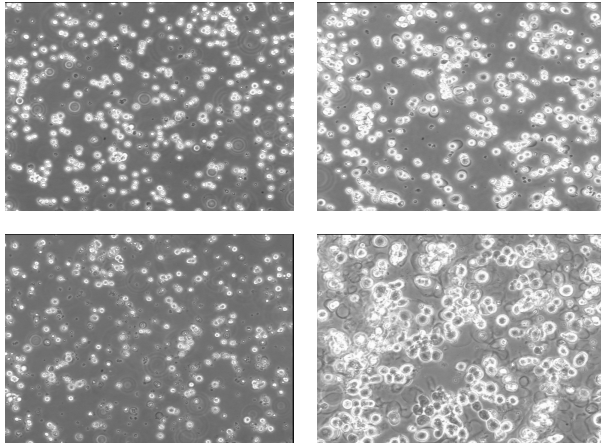
**Abb. 25. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + T4 und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + T4 kultiviert.

Abbildung 25 zeigt die ALP-Aktivität bei den Proben mit T4. Die Aktivität in den Proben mit Synovialflüssigkeit ist im Gegensatz zu den Proben mit DMEM deutlich erhöht, wobei die Ansätze mit Synovialflüssigkeit am Tag 14 der Kulturdauer auf eine Hypertrophie hindeuten.

Auch bei diesen Proben wurden, wie schon im Kapitel vorher alle zwei Tage Photos der Proben am Mikroskop gefertigt, um einen eventuellen Unterschied darzustellen.

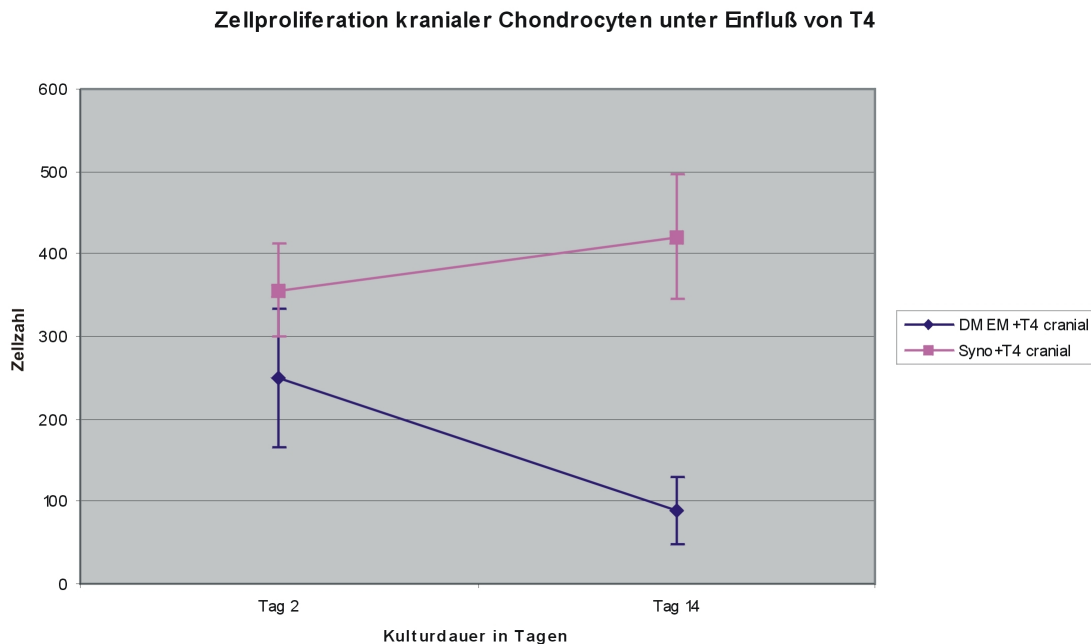




**Abb. 26 . Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 2**

Li. oben: Kultur mit DMEM + T4 am Tag 2 Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + T4 am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM + T4 am Tag 14 Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + T4 am Tag 14

Die ALP-Aktivität in den Proben mit Synovialflüssigkeit und T4 ist höher als die Aktivität in den Proben mit DMEM und T4, daß spiegelt sich auch auf den Fotos der Probe mit Synovialflüssigkeit und T4 wider, die eine deutlich veränderte Morphologie der Chondrocyten mit einer ausgeprägten extrazellulären Matrix zeigen.

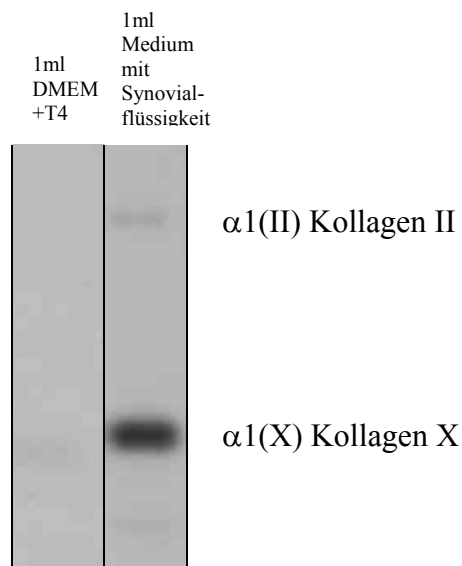


**Abb. 27. Zellproliferation kranialer Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen**  
 Vergleich der Zellproliferation zwischen Proben mit DMEM + T4 und Synovialflüssigkeit + T4.

Abbildung 27 zeigt die Zellproliferation der Versuchsansätze mit DMEM und T4 sowie die Ansätze mit late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit und T4. Wie schon im vorausgegangenen Kapitel beobachtet, zeigen auch hier die Proben mit Synovialflüssigkeit und T4 eine Zunahme der Zellzahl.

Die Zahl steigt innerhalb von 12 Tagen von durchschnittlich 356 auf 421 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Dies entspricht einer Proliferation von ca. 18%.

Betrachtet man hingegen die Proben mit DMEM und T4 ist eine deutliche Zellabnahme ersichtlich. Die Zahl sinkt innerhalb von 12 Tagen von durchschnittlich 249 auf 89 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Dies entspricht einer Zellabnahme von ca. 64%.



**Abb. 28. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 2 zum Nachweis von Kollagen X.**

Li.: Probe, in der kraniale Chondrocyten mit 1ml DMEM + T4 über 14 Tage kultiviert wurde,

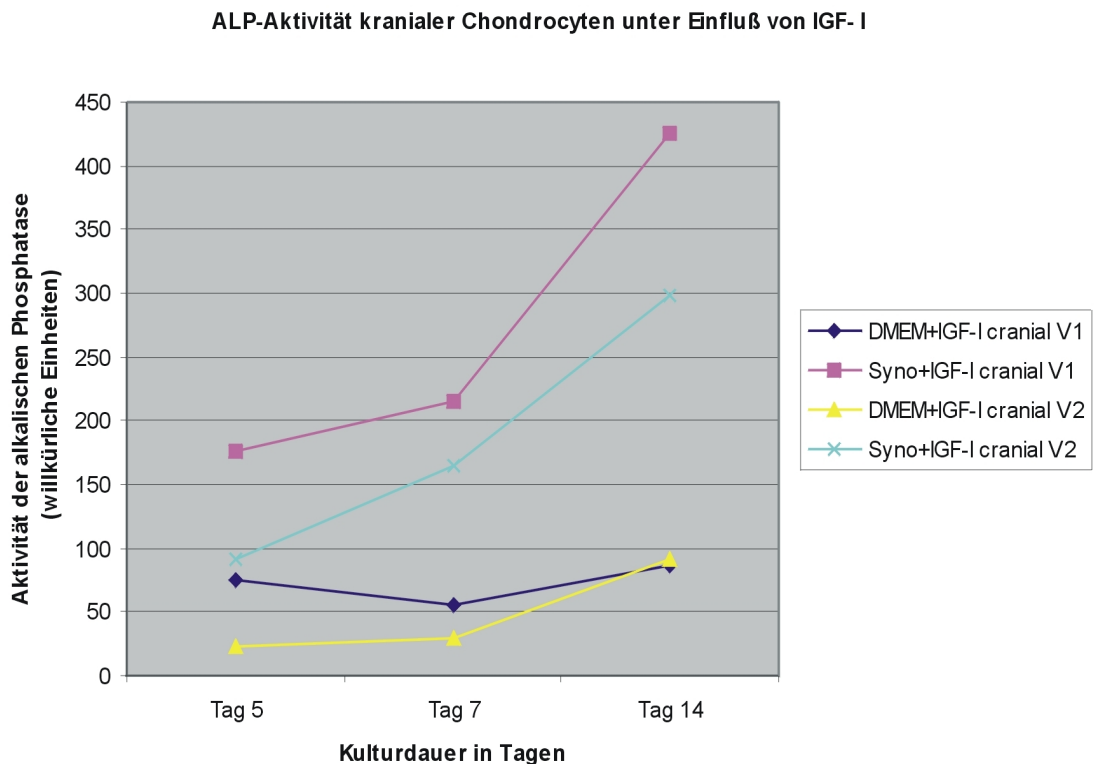
Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + T4 nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

Kollagen X als Hypertrophie-Marker ist deutlich bei dem Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels der Probe mit Synovialflüssigkeit und T4 erkennbar, während die Probe mit DMEM und T4 keine erkennbare Bande mit Kollagen X aufweist (Abbildung 28).

### 3.2.1.2 IGF-I

Auch bei diesem Versuchsansatz wurden jeweils Proben mit DMEM und IGF-I sowie Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Es wurden 100ng IGF-I auf 1ml DMEM oder Synovialflüssigkeit gegeben.

Abbildung 29 zeigt eine Erhöhung der ALP-Aktivität bei den Proben, die mit Synovialflüssigkeit und IGF-I kultiviert wurden, während die Proben mit DMEM und IGF-I nur eine geringe Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase erkennen lassen.



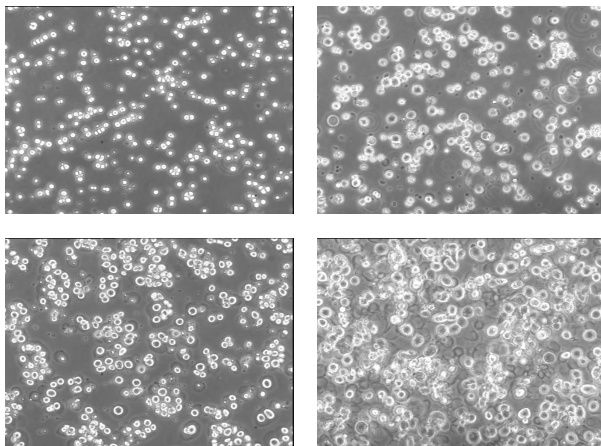
**Abb. 29. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + IGF-I und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + IGF-I kultiviert.

Auch die mikroskopischen Bildaufnahmen lassen einen deutlichen Unterschied zwischen den Proben mit DMEM und IGF-I und den Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I erkennen.

In Abbildung 30 zeigen die Proben mit DMEM und IGF-I nach einem Zeitraum von 12 Tagen eine mäßige Vergrößerung der Zellen, auch ist bereits um einige Zellen herum die Bildung extrazellulärer Matrix zu sehen.

Im Vergleich mit den daneben abgebildeten Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I, ist erkennbar, daß die Chondrocyten in den Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I bereits am zweiten Tag der Kulturdauer das gleiche Stadium der Hypertrophie aufweisen, wie die Proben mit DMEM und IGF-I am Tag 14 der Kulturdauer. Auf dem Photo der Probe mit Synovialflüssigkeit und IGF-I am Tag 14 der Kulturdauer ist eine ausgeprägte extrazelluläre Matrix um hypertrophierte Zellen sichtbar.



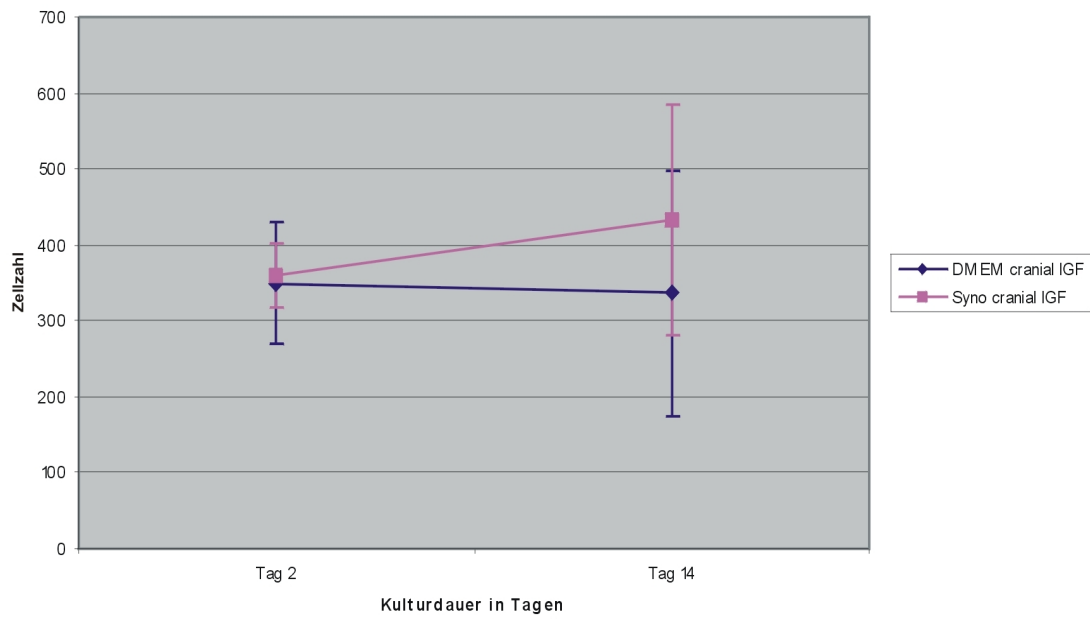
**Abb. 30 . Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 1.**

Li. oben: Kultur mit DMEM + IGF-I am Tag 2 Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + IGF-I am Tag 2  
Li. unten: Kultur mit DMEM + IGF-I am Tag 14 Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + IGF-I am Tag 14

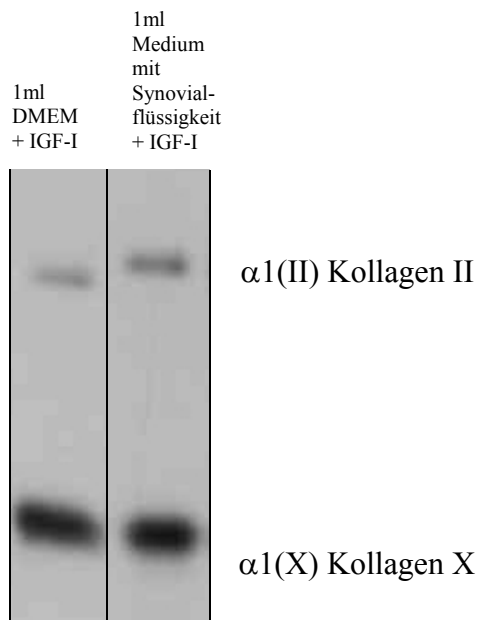
Die Zellproliferation für die Versuchsansätze mit IGF-I ist in Abbildung 31 dargestellt. Während bei den Proben mit DMEM die Zellzahl von durchschnittlich 349 auf 336 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt sinkt, steigt die Zellzahl in den Proben mit Synovialflüssigkeit von durchschnittlich 228 auf 303 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Dies entspricht bei den Proben mit DMEM und IGF-I einer Zellabnahme um ca. 4% und bei den Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I einer Zellzunahme von ca. 33%.

Das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels (Abbildung 32), zeigt sowohl bei den Proben mit DMEM und IGF-I als auch bei den Proben mit Synovialflüssigkeit und IGF-I deutliche Kollagen-X-Banden.

### Zellproliferation kranialer Chondrocyten unter Einfluß von IGF-I



**Abb. 31. Zellproliferation kranialer Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen.**  
 Vergleich der Zellproliferation zwischen Proben mit DMEM + IGF-I und Synovialflüssigkeit + IGF-I.



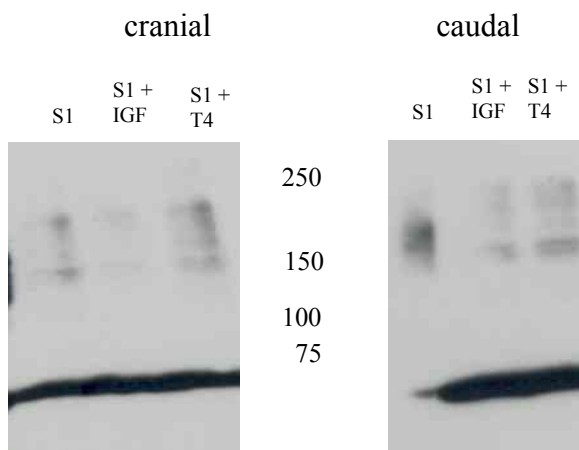
**Abb. 32. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 2 zum Nachweis von Kollagen X.**  
 Li.: Probe, in der kraniale Chondrocyten mit 1ml DMEM + IGF-I über 14 Tage kultiviert wurden  
 Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + IGF-I nach einer Kulturdauer von 14 Tagen

### 3.2.1.3 MMP-3-Inhibitor II

Den Proben mit DMEM und Synovialflüssigkeit wurden jeweils 15µM MMP-3-Inhibitor II hinzugefügt, da der Immunoblot von Versuch 1 ergeben haben, daß in der Synovialflüssigkeit MMP-13 vorhanden ist (Abbildung 33).

Außerdem lassen verschiedene gelatinolytische Banden in den Gelatine-Gelen vermuten, daß zusätzlich zu MMP-13 noch pro MMP-9, MMP-9, pro MMP-2 und MMP-2 in den übrigen Synovialflüssigkeiten vieler Versuche vorhanden sind. Neben MMP-13 hemmt der MMP-3-Inhibitor II die Matrix-Metalloproteasen 1,2,3,7,8,9, und 14.

Auch bei diesem Versuch betrug die Kulturdauer 14 Tage, in denen mehrfach die ALP-Aktivität bestimmt wurde, alle zwei bis drei Tage Photos am Mikroskop erstellt wurden und ein Fluorogramm eines SDS-PAGE-Gels zum Nachweis von Kollagen X analysiert wurde.

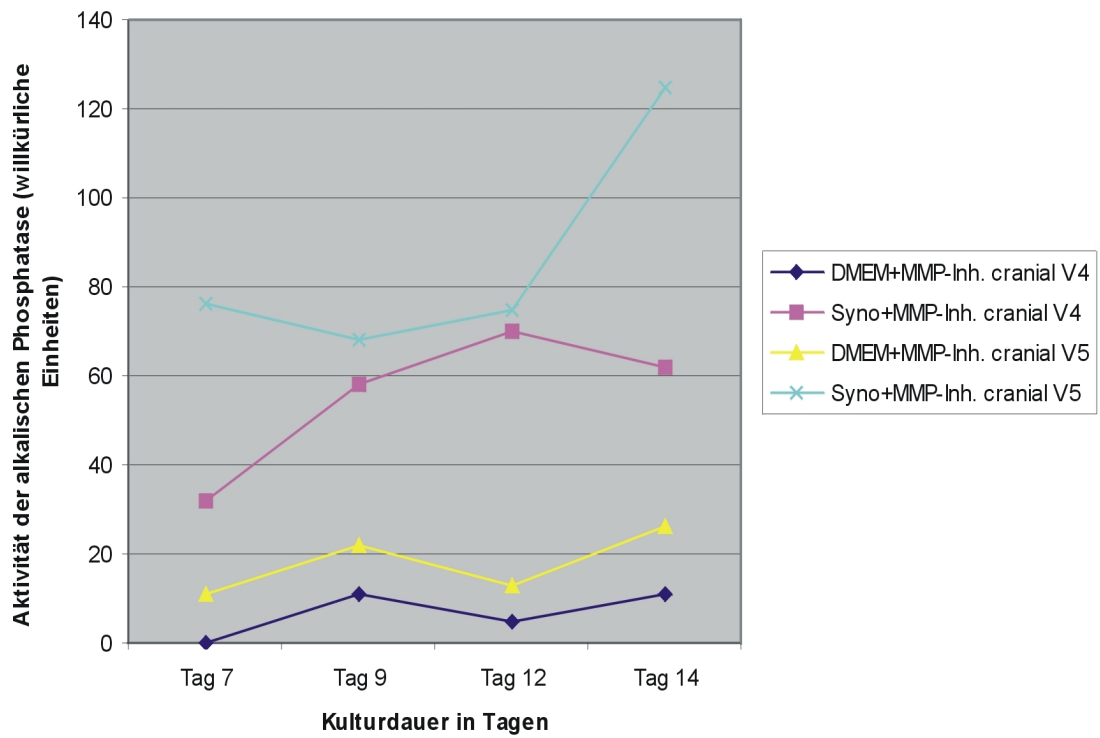


**Abb. 33. Immunoblot nach 30 Minuten Anti MMP 13**  
hierbei wurde Synovialflüssigkeit aus dem 1. Versuch verwendet (S1),  
erkennbare Bande bei ca. 60 kDa

Abbildung 34 zeigt eine deutliche Erhöhung der ALP-Aktivität zwischen Tag 7 und Tag 14 der Kulturdauer in den Proben kranialer Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor kultiviert wurden.

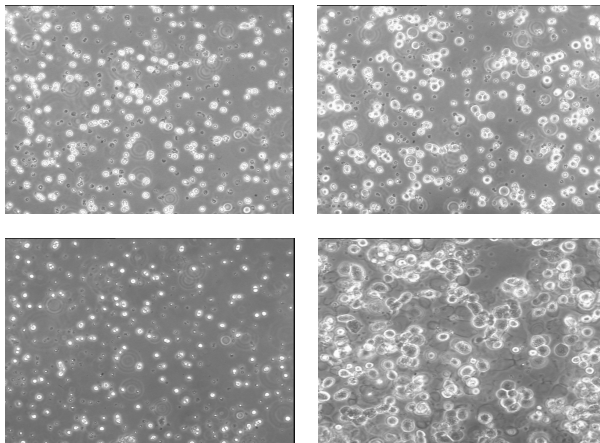
Die Proben kranialer Chondrocyten, die mit DMEM und MMP-Inhibitor kultiviert wurden, zeigen hingegen nur geringe Schwankungen der Aktivität zwischen Tag 7 und Tag 14 der Kulturdauer.

### ALP-Aktivität kranialer Chondrocyten unter Einfluß von MMP-Inhibitor



**Abb. 34. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten.**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + MMP-Inh. und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + MMP-Inh. kultiviert.



**Abb. 35. Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 4**

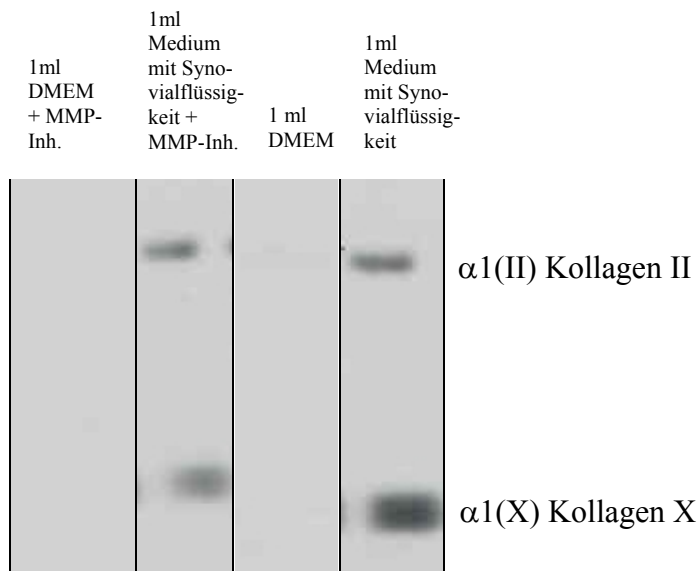
Li.: oben: Kultur mit DMEM + MMP-Inh. am Tag 2 Re.: oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + MMP-Inh. am Tag 2  
 Li.: unten: Kultur mit DMEM + MMP-Inh. am Tag 14 Re.: unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + MMP-Inh. am Tag 14

Wie auch in den vorangegangenen Versuchsansätzen mit T4 und IGF-I ist auch hier bei den Photos in Abbildung 35 eine Zunahme des Zellvolumens und der Zellzahl bei den Proben mit

Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor zu beobachten. Innerhalb von 12 Tagen hat sich bei diesen Proben zudem eine ausgeprägte extrazelluläre Matrix entwickelt, die sich als Halo um die kranialen Chondrocyten gelegt hat.

Wie bei den Mikroskop-Photos der Proben mit DMEM und MMP-Inhibitor ersichtlich, kommt es innerhalb von 12 Tagen zu einer Abnahme des Zellvolumens und der Zellzahl.

Konform zu den vorherigen Ergebnissen dieses Versuchsansatzes, zeigt das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels in Abbildung 36 eine Bande für Kollagen X als Hypertrophiemarker der kranialen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor kultiviert wurden, während die kranialen Chondrocyten, die mit DMEM und MMP-Inhibitor kultiviert wurden, keine Banden als Hinweis für eine Hypertrophie aufweisen.



**Abb. 36. Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 4 zum Nachweis von Kollagen X**

Li.: Probe, in der kraniale Chondrocyten mit 1ml DMEM + MMP-Inh. über 14 Tage kultiviert wurden

Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + MMP-Inh. nach einer Kulturdauer von 14 Tagen

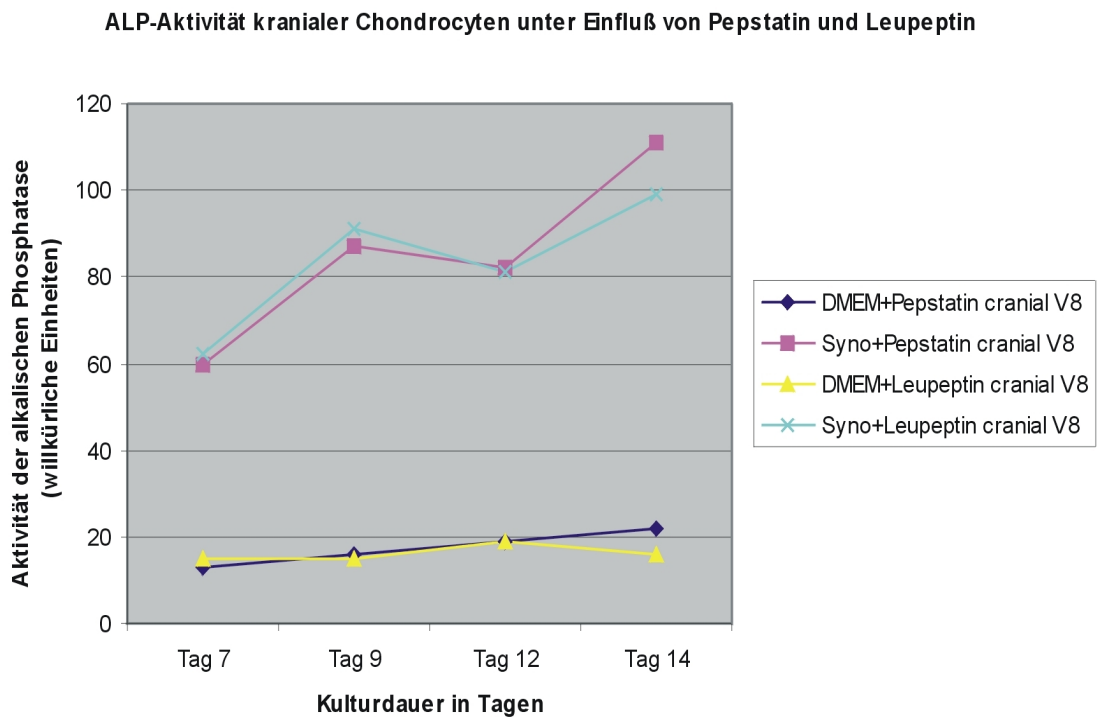


### 3.2.1.4 Protease-Inhibitoren und Komplexbildner

#### 3.2.1.4.1 Leupeptin und Pepstatin

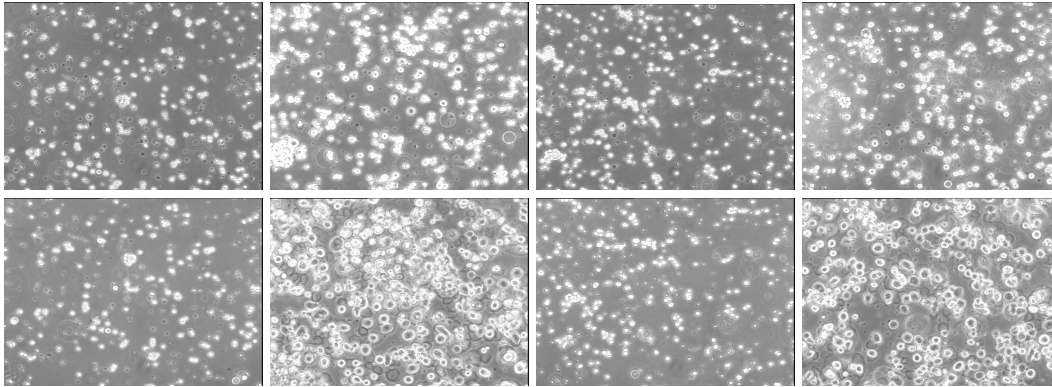
Den Proben des achten Versuchs wurde zum einen Leupeptin und zum anderen Pepstatin beigefügt. Leupeptin mit einer Konzentration von  $2\mu\text{g/ml}$  und Pepstatin von  $2\mu\text{g/ml}$ . Bei beiden Substanzen handelt es sich um Protease-Inhibitoren. Pepstatin ist ein Pepsin- und Aspartat-Inhibitor, Leupeptin inhibiert Serin- und Thiolproteasen.

Betrachtet man nun die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Versuch 8 (Abbildung 37), ist erkennbar, daß die Proben mit Synovialflüssigkeit, trotz der Protease-Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin, im Gegensatz zu den Proben mit DMEM als Medium, deutlich erhöht ist.



**Abb. 37. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten.**

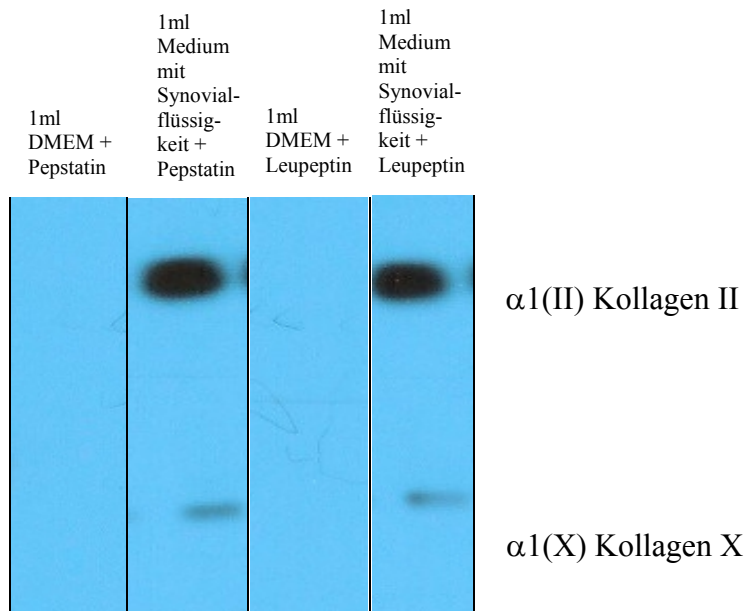
Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + Leupeptin oder Pepstatin und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + Leupeptin oder Pepstatin kultiviert.



**Abb. 38. Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 8**

- |  |   |
|--|---|
| 1. oben: Kultur mit DMEM + Pepstatin am Tag 2                | 1. unten: Kultur mit DMEM + Pepstatin am Tag 9                |
| 2. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Pepstatin am Tag 2 | 2. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Pepstatin am Tag 9 |
| 3. oben: Kultur mit DMEM + Leupeptin am Tag 2                | 3. unten: Kultur mit DMEM + Leupeptin am Tag 9                |
| 4. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Leupeptin am Tag 2 | 4. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Leupeptin am Tag 9 |

Die Photos in Abbildung 38 sind konform zu der ALP-Aktivität. Die Proben in mit Synovialflüssigkeit und den Protease-Inhibitoren zeigen nach 14 Tagen Kulturdauer eine Vermehrung der Zellzahl sowie die Bildung von extrazellulärer Matrix, während die Zellen, die mit DMEM und den Protease-Inhibitoren kultiviert wurden, eine Zellabnahme und keine ausgeprägte Bildung von extrazellulärer Matrix erkennen lassen.



**Abb. 39. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 8 zum Nachweis von Kollagen X.**  
 Li.: Proben, in der kraniale Chondrocyten zum einen mit 1ml DMEM + Pepstatin und zum anderen synovialflüssigkeitshaltigem Medium + Pepstatin über 14 Tage kultiviert wurden  
 Re.: Proben, die zum einen mit 1ml DMEM + Leupeptin und zum anderen mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + Leupeptin über 14 Tage kultiviert wurden

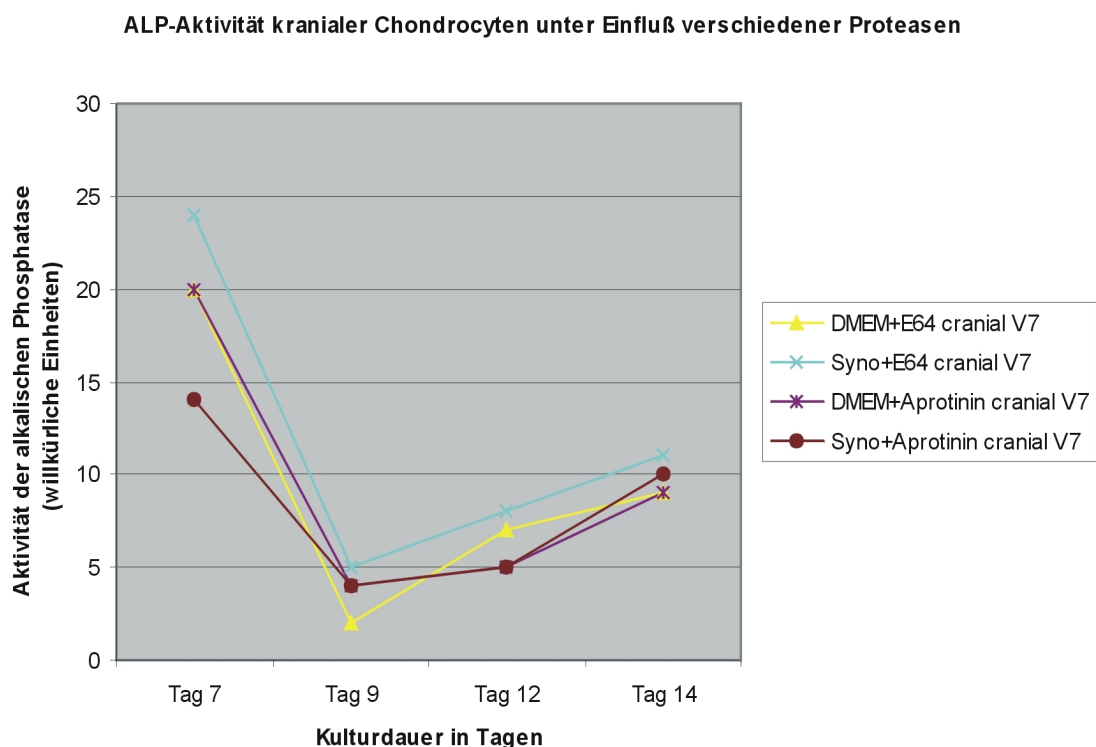
Das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels in Abbildung 39 zeigt durch Kollagen-X-Banden die Hypertrophie der kranialen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit und den Protease-Inhibitoren Pepstatin und Leupeptin kultiviert wurden. Die Proben mit DMEM und den Protease-Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin weisen keine Kollagen-X-Banden auf.

### 3.2.1.4.2 Weitere Protease-Inhibitoren

Zusätzlich wurden zwei weitere Protease-Inhibitoren verwendet, um deren Wirkung auf die Chondrocyten-Spätendifferenzierung darzustellen.

Es wurden zum einen E64 in einer Menge von 5µg/ml und zum anderen Aprotinin in einer Menge von 5µg/ml den Proben mit Synovialflüssigkeit und den Proben mit DMEM beigefügt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert.

E64 ist ein irreversibler Cystein-Protease-Inhibitor.

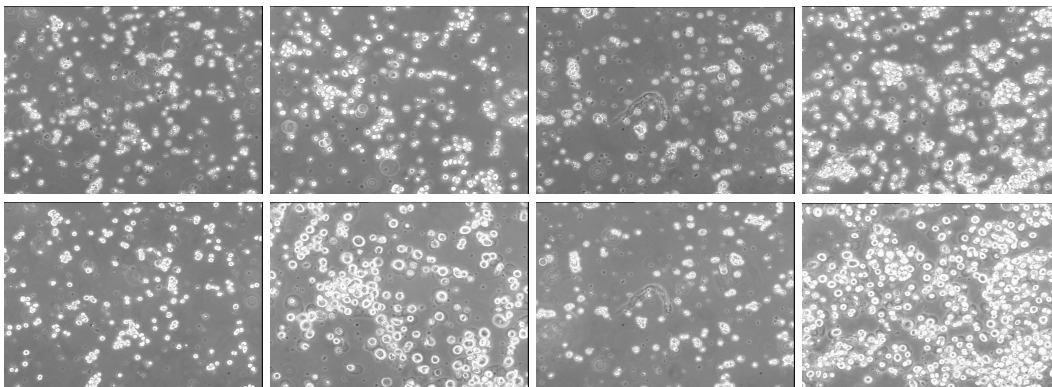


**Abb. 40. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten.**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + verschiedene Protease-Inhibitoren und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + verschiedene Protease-Inhibitoren kultiviert.

Die in Abbildung 40 dargestellte Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigt keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Proben, die mit DMEM und den Protease-Inhibitoren kultiviert wurden und den Proben, die mit Synovialflüssigkeit und den Protease-Inhibitoren kultiviert wurden. Es ist sowohl bei den Proben mit DMEM als auch bei den Proben mit Synovialflüssigkeit eine Abnahme der Aktivität zwischen Tag 7 und Tag 14 der Kulturdauer zu erkennen.

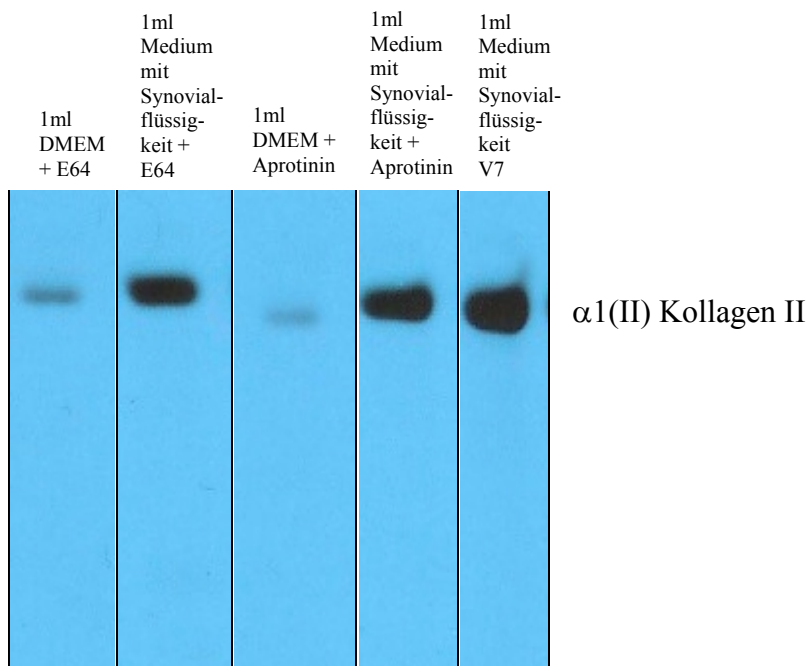
Die mikroskopischen Aufnahmen der Chondrocyten, die in Abbildung 41 zu sehen sind, zeigen bei den Proben, die mit Synovialflüssigkeit und den Protease-Inhibitoren kultiviert wurden, zwar eine Vermehrung der Zellzahl und eine Größenzunahme der Zellen, es fehlt jedoch die Bildung der extrazellulären Matrix, die in den vorhergegangenen Kapiteln bei den Proben, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, zu sehen war. Die Proben, die mit DMEM und den Protease-Inhibitoren kultiviert wurden, zeigen eine geringfügige Abnahme der Zellzahl zwischen Tag 2 und Tag 14 der Kulturdauer.



**Abb. 41. Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 7**

- |  |  |
|--|--|
| 1. oben: Kultur mit DMEM + E64 am Tag 2                      | 1. unten: Kultur mit DMEM + E64 am Tag 14                      |
| 2. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + E64 am Tag 2       | 2. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + E64 am Tag 14       |
| 3. oben: Kultur mit DMEM + Aprotinin am Tag                  | 3. unten: Kultur mit DMEM + Aprotinin am Tag 14                |
| 4. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Aprotinin am Tag 2 | 4. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + Aprotinin am Tag 14 |

Auch das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels aus Versuch 7 läßt, genau wie die Aktivität der alkalischen Phosphatase, keine Hinweise auf eine Hypertrophie der kranialen Chondrocyten erkennen, da die charakteristischen Kollagen-X-Banden fehlen.



**Abb. 42. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 7 zum Nachweis von Kollagen X**

- Li.: Proben, in der kraniale Chondrocyten zum einen mit 1ml DMEM + E64 und zum anderen synovialflüssigkeitshaltigem Medium + E64 über 14 Tage kultiviert wurden
- Re.: Proben, die zum einen mit 1ml DMEM + Aprotinin und zum anderen mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + Aprotinin über 14 Tage kultiviert wurden
- Re.außen: Probe, die nur mit synovialflüssigkeitshaltigem Medium aus Versuch 7 kultiviert wurde

Hier sei allerdings erwähnt, daß auch die Positiv-Kontrolle (Probe allein mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt ohne Protease-Inhibitoren) keine Kollagen-X-Bande aufweist (Abbildung 42).

Somit kann festgehalten werden, daß die Wirkung der Synovialflüssigkeiten auf die Chondrocyten individuell, d.h. je nach Patient, eine unterschiedliche Ausprägung aufweist.

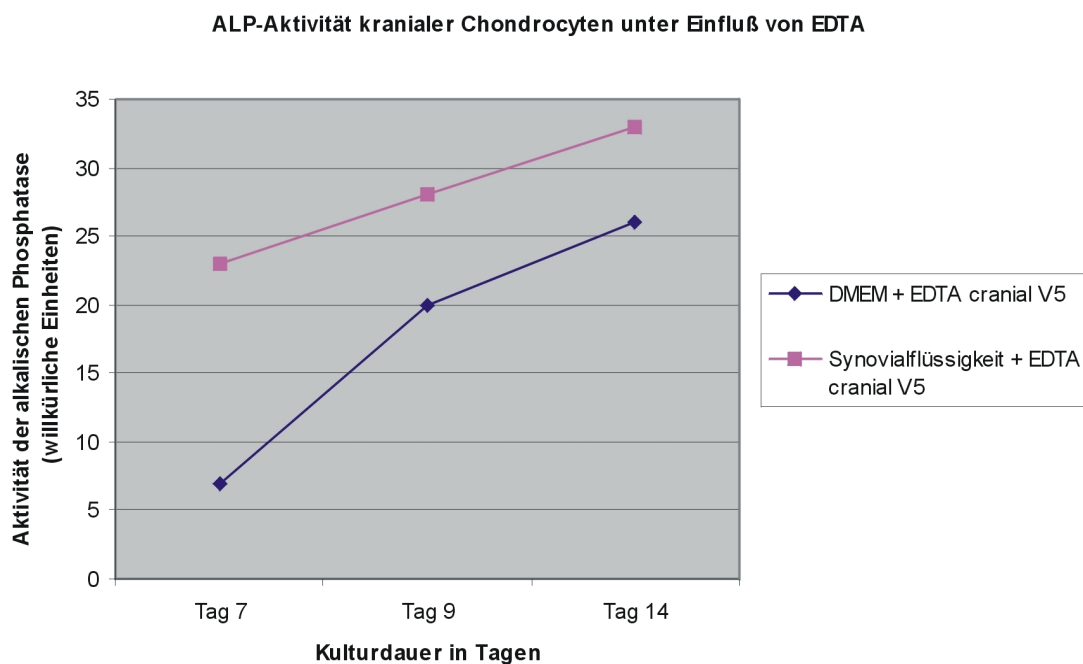
#### 3.2.1.4.3 Komplexbildner

Als Komplexbildner wurde bei Versuch 5 EDTA in einer Konzentration von 1mM den Proben mit DMEM und Synovialflüssigkeit zugefügt.

Ethylendiamintetraessigsäure ist ein organischer Komplexbildner, der bevorzugt zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  bindet. EDTA wird Enzymlösungen beigefügt, um Metallionen zu binden, die eine Enzymaktivitätshemmung von Metalloenzymen zu verursachen.

Betrachtet man nun die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Abbildung 43, zeigt sich nur ein geringfügiger Unterschied in der Aktivität zwischen der Probe mit Synovialflüssigkeit und EDTA und der Probe mit DMEM und EDTA.

Der Verlauf der Aktivitätskurve ist annähernd gleich mit jeweils der höchst gemessenen Aktivität am Tag 14 der Kulturdauer. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den vorangegangenen Versuchansätzen, wird deutlich, daß der Unterschied zwischen DMEM und der Synovialflüssigkeit zwar vorhanden ist, aber weniger markant als in den anderen Versuchsansätzen.

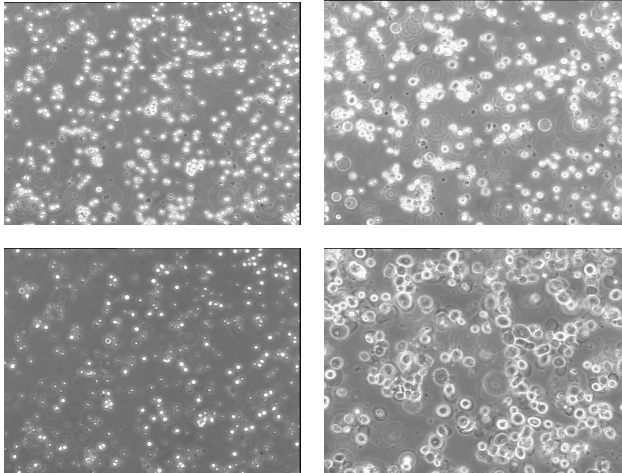


**Abb. 43. Aktivität der ALP im Medium kranialer Chondrocyten**  
Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM EDTA und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + EDTA kultiviert.

Abbildung 44 zeigt die mikroskopisch gefertigten Aufnahmen der Chondrocyten die mit DMEM und EDTA sowie Synovialflüssigkeit und EDTA über 14 Tage kultiviert wurden.

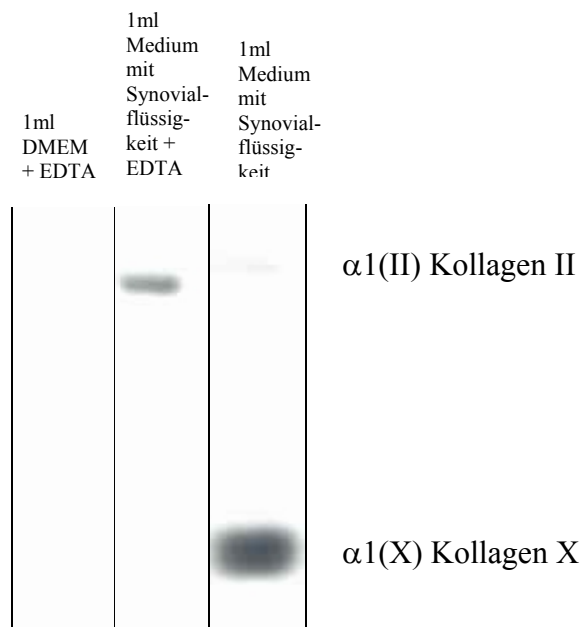
Die Bilder links zeigen den Unterschied der Probe mit DMEM und EDTA zwischen Tag 2 und Tag 14 der Kulturdauer. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchansätzen mit DMEM zeigt sich hier am Tag 14 ein vermehrter Zelluntergang.

Die Probe mit Synovialflüssigkeit und EDTA zeigt hingegen am Tag 14 der Kulturdauer eine geringe Zellzahlzunahme und eine ausgeprägte Vergrößerung der Chondrocyten mit einer minimalen Bildung von extrazellulärer Matrix.



**Abb. 44. Photos kranialer Chondrocyten aus Versuch 5**

Li. oben: Kultur mit DMEM + EDTA am Tag 2    Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + EDTA am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM + EDTA am Tag 14    Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + EDTA am Tag 14



**Abb. 45. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 5 zum Nachweis von Kollagen X.**

Li. und Mitte : Proben, in der kraniale Chondrocyten zum einen mit 1ml DMEM + EDTA und zum anderen synovialflüssigkeitshaltigem Medium + EDTA über 14 Tage kultiviert wurden  
 Re.: Probe, die nur mit synovialflüssigkeitshaltigem Medium über 14 Tage kultiviert wurden

Das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 5 (Abbildung 45) zeigt deutlich; es gibt weder in der Probe mit DMEM und EDTA, noch in der Probe mit Synovialflüssigkeit und EDTA eine sichtbare Kollagen-X-Bande, während die Positiv-Kontrolle mit 1ml Synovialflüssigkeit eine breite Kollagen-X-Bande als Hypertrophiemarker der kranialen Chondrocyten erkennen läßt.

### **3.2.2**      *Kaudale Chondrocyten*

Wie schon bei den kranialen Chondrocyten, soll nun auch bei den kaudalen Chondrocyten festgestellt werden, welchen Einfluß lösliche Faktoren in Kultur mit late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeit auf die Spätdifferenzierung haben kann. Da in den Proben mit kaudalen Chondrocyten (siehe Kapitel 3.1.2.), die allein mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, keine Hypertrophie ausgelöst werden konnte, soll nun geklärt werden, ob bestimmt lösliche Faktoren zusammen mit der Synovialflüssigkeit eine Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten auslösen kann.

#### **3.2.2.1**      Thyroxin, T4

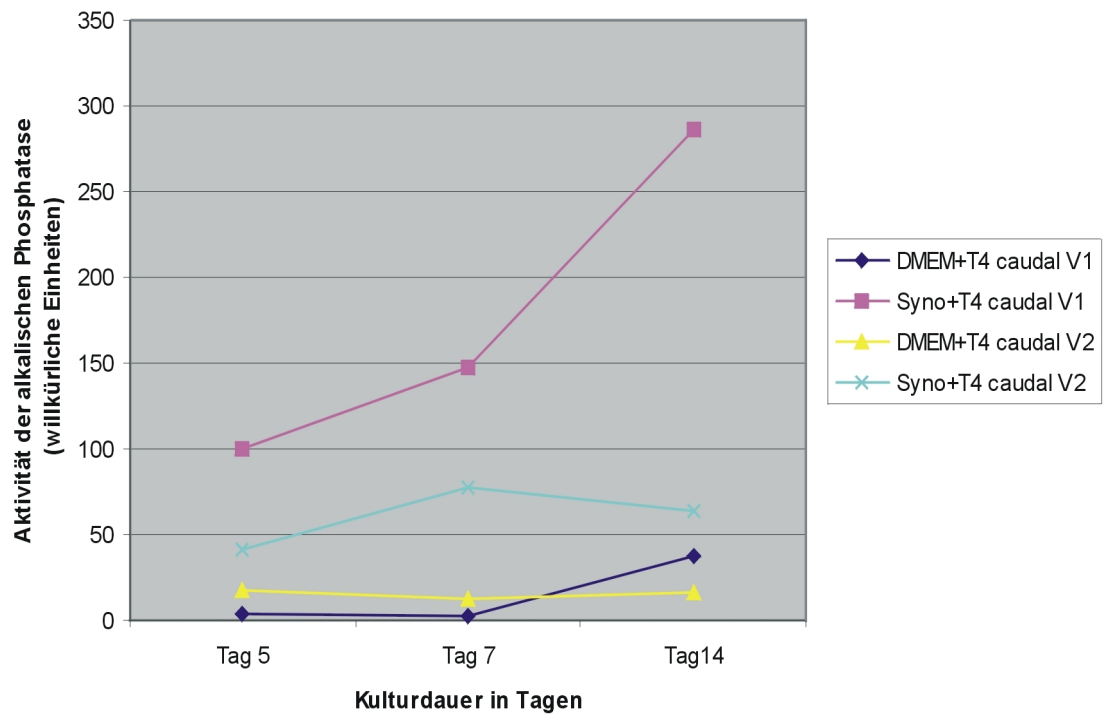
Auch bei den Versuchsansätzen mit kaudalen Chondrocyten wurden 25ng T4 auf 1 ml DMEM oder Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt gegeben.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abbildung 46) zeigt bei der Probe mit der Synovialflüssigkeit aus Versuch 1 eine deutliche Erhöhung am Tag 14 der Kulturdauer, während die Probe mit der Synovialflüssigkeit aus Versuch 2 keinen deutlichen Unterschied zu den Proben mit DMEM und T4 erkennen lassen.

Betrachtet man nun dazu die mikroskopischen Photos (Abbildung 47) der kaudalen Chondrocyten aus Versuch 1, zeigt sich, daß die Zellzahl und das Zellvolumen der Probe mit Synovialflüssigkeit und T4 bis Tag 14 der Kulturdauer zugenommen hat, während die Probe mit DMEM und T4 eher einen Zelluntergang aufweist.

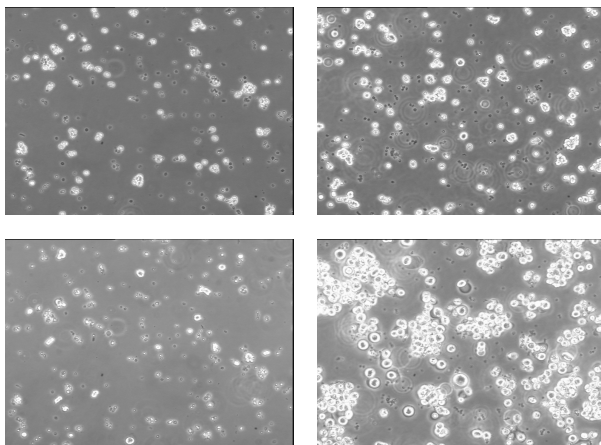


### ALP-Aktivität kaudaler Chondrocyten unter Einfluß von T4



**Abb. 46. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + T4 und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + T4 kultiviert.

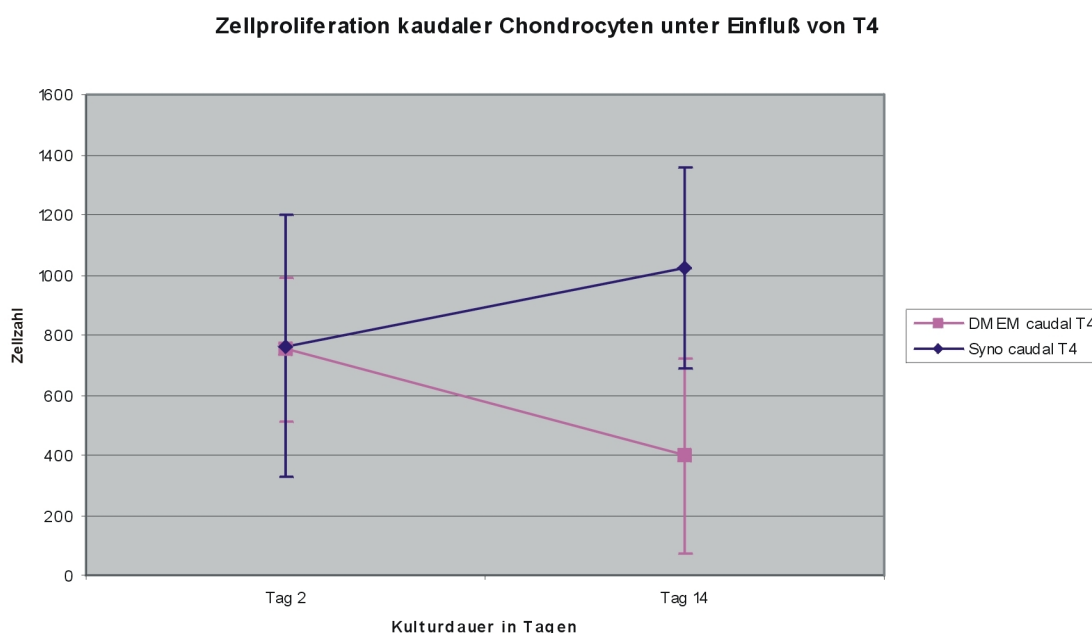


**Abb. 47. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 1**

Li. oben: Kultur mit DMEM + T4 am Tag 2    Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + T4 am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM + T4 am Tag 14    Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + T4 am Tag 14

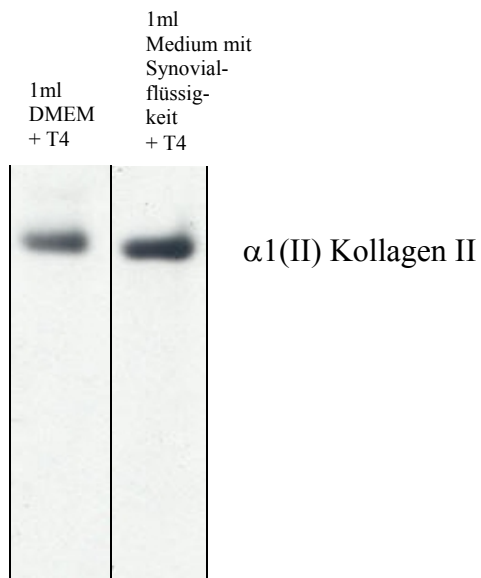
Die Zunahme der Zellzahl ist mittels Abbildung 48 graphisch dargestellt. Zwischen Tag 2 und Tag 14 der Kulturdauer ist die Zellzahl in den Proben mit Synovialflüssigkeit und T4 durchschnittlich von 768 Zellen auf durchschnittlich 1022 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt gestiegen. Dies entspricht einer Proliferation von ca. 33 %.

Schaut man sich hingegen die Proben mit DMEM und T4 an, zeichnet sich eine Abnahme der Zellzahl von durchschnittlich 751 Zellen am Tag 2 der Kulturdauer auf durchschnittlich 397 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt am Tag 14 der Kulturdauer ab. Dies entspricht einem Zelluntergang von ca. 47%.



**Abb. 48. Zellproliferation kaudaler Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen**  
 Vergleich der Zellproliferation zwischen Proben mit DMEM + T4 und Synovialflüssigkeit + T4

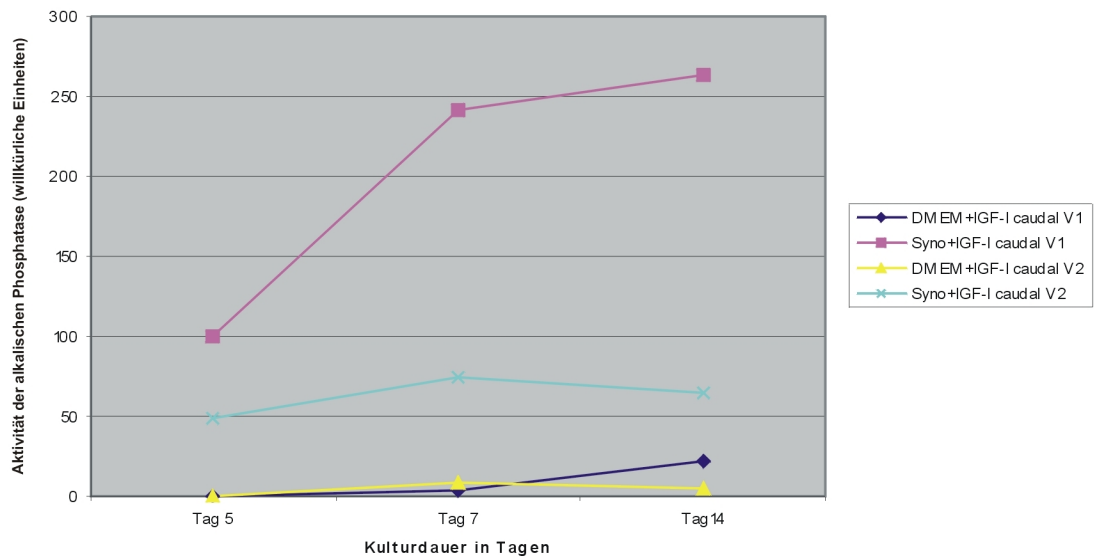
Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Versuch 1 läßt vermuten, daß es in der Probe mit Synovialflüssigkeit und T4 zu einer Hypertrophie der Zellen gekommen ist (Abbildung 46). Das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels von Versuch 1 zeigt jedoch keine Kollagen-X-Bande als Marker der Hypertrophie in der Probe mit Synovialflüssigkeit und T4 (Abbildung 49).



**Abb. 49. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 1 zum Nachweis von Kollagen X.**  
 Li.: Probe, in der kaudale Chondrocyten mit 1ml DMEM + T4 über 14 Tage kultiviert wurden,  
 Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + T4 nach einer Kulturdauer von 14 Tagen

### 3.2.2.2 IGF-I

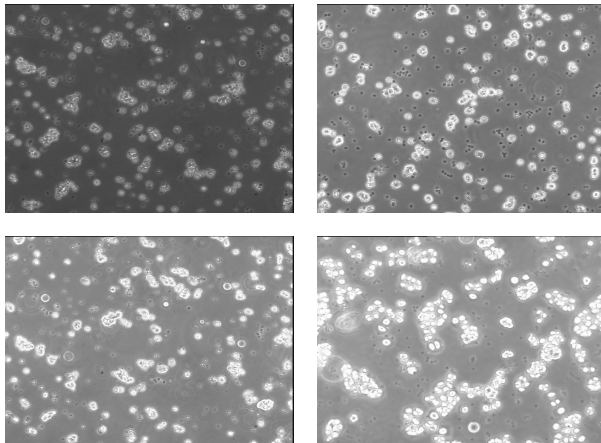
**ALP-Aktivität kaudaler Chondrocyten unter Einfluß von IGF- I**



**Abb. 50. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten**  
 Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + IGF-I und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + IGF-I kultiviert.

Unter Zugabe von IGF-I zu kaudalen Chondrocyten zeigt sich bei der ALP-Aktivitätsbestimmung in Versuch 1 eine markante Erhöhung in der Probe mit Synovialflüssigkeit.

Im Vergleich zu Versuch 1, ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Probe mit Synovialflüssigkeit in Versuch 2 eher gering, aber höher als in den Proben mit DMEM und IGF-I aus Versuch 1 und 2 (Abbildung 50).



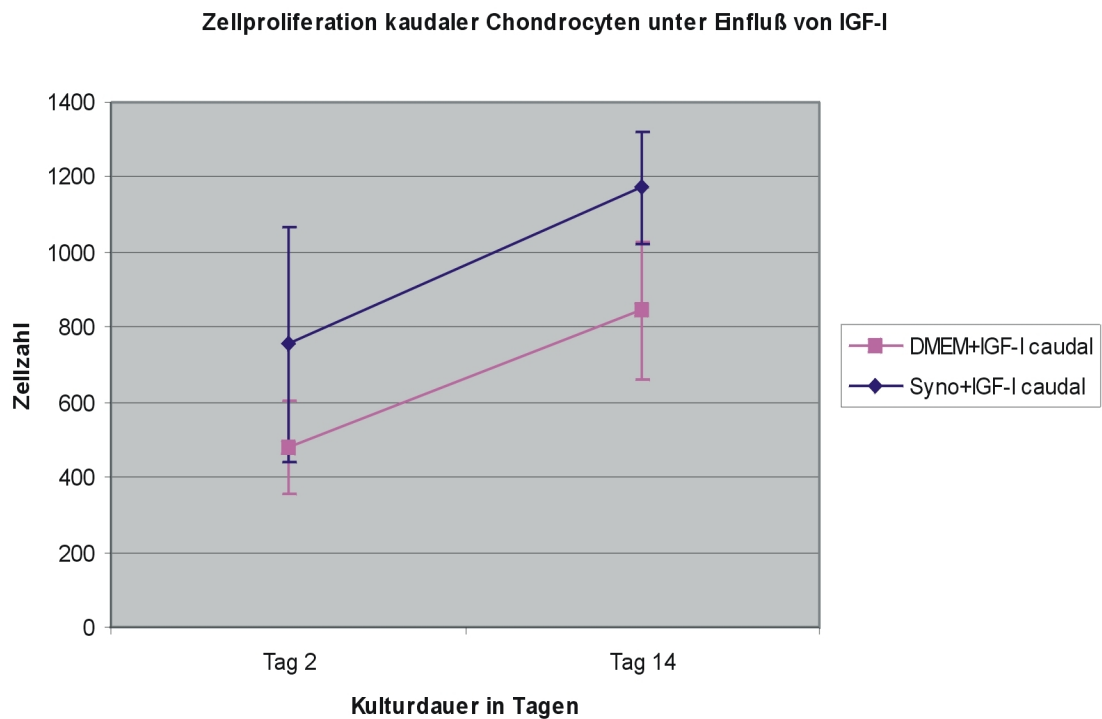
**Abb. 51. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 1.**

Li. oben: Kultur mit DMEM + IGF-I am Tag 2 Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + IGF-I am Tag 2  
Li. unten: Kultur mit DMEM + IGF-I am Tag 14 Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + IGF-I am Tag 14

Die mikroskopisch gefertigten Photos der Probe mit DMEM und IGF-I aus Versuch 1 (links in der Abbildung 51) zeigen im Verlauf von 12 Tagen eine Zunahme der Zellzahl sowie eine Zellvergrößerung, wenngleich jedoch keine extrazelluläre Matrix erkennbar ist. Die Photos der Probe mit Synovialflüssigkeit und IGF-I aus Versuch 1 (rechts in der Abbildung 51) liefert ein ähnliches Ergebnis wie die Bilder links daneben. Es ist im Verlauf von 12 Tagen eine Zellvergrößerung und eine Zunahme der Zellzahl zu beobachten, während eine Bildung von extrazellulärer Matrix ausbleibt.

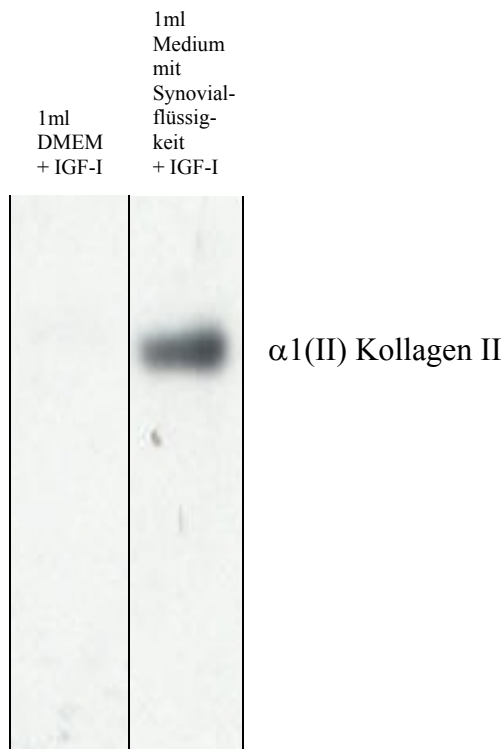
Die Zellzahl der Probe mit DMEM und IGF-I ist innerhalb von 12 Tagen von durchschnittlich 480 Zellen auf durchschnittlich 844 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt gestiegen. Das entspricht einer Proliferation von ca. 76%.

Auch die Probe mit Synovialflüssigkeit und IGF-I aus Versuch 1 zeigt innerhalb von 12 Tagen einen Anstieg der Zellzahl von durchschnittlich 754 Zellen auf durchschnittlich 1172 Zellen pro beobachteten Probenabschnitt. Dies entspricht einer Zellproliferation von ca. 54% (Abbildung 52).



**Abb. 52. Zellproliferation kaudaler Chondrocyten bei einer Kulturdauer von 14 Tagen**  
Vergleich der Zellproliferation zwischen Proben mit DMEM + IGF-I und Synovialflüssigkeit + IGF-I.

Das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels (Abbildung 53) zeigt, daß die kaudalen Chondrocyten auch unter Einfluß von IGF-I weder in der Probe mit DMEM noch in der Probe mit Synovialflüssigkeit Kollagen X bilden und somit der Marker für eine Hypertrophie der kaudalen Zellen fehlt. Lediglich die Kollagen-II-Bande ist in der Probe mit der Synovialflüssigkeit und IGF-I deutlicher ausgeprägt als in der Probe mit DMEM und IGF-I.



**Abb. 53. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 1 zum Nachweis von Kollagen X**  
 Li.: Probe, in der kaudale Chondrocyten mit 1ml DMEM + IGF-I über 14 Tage kultiviert wurden,  
 Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + IGF-I nach einer Kulturdauer von 14 Tagen

### 3.2.2.3 MMP-3-Inhibitor II

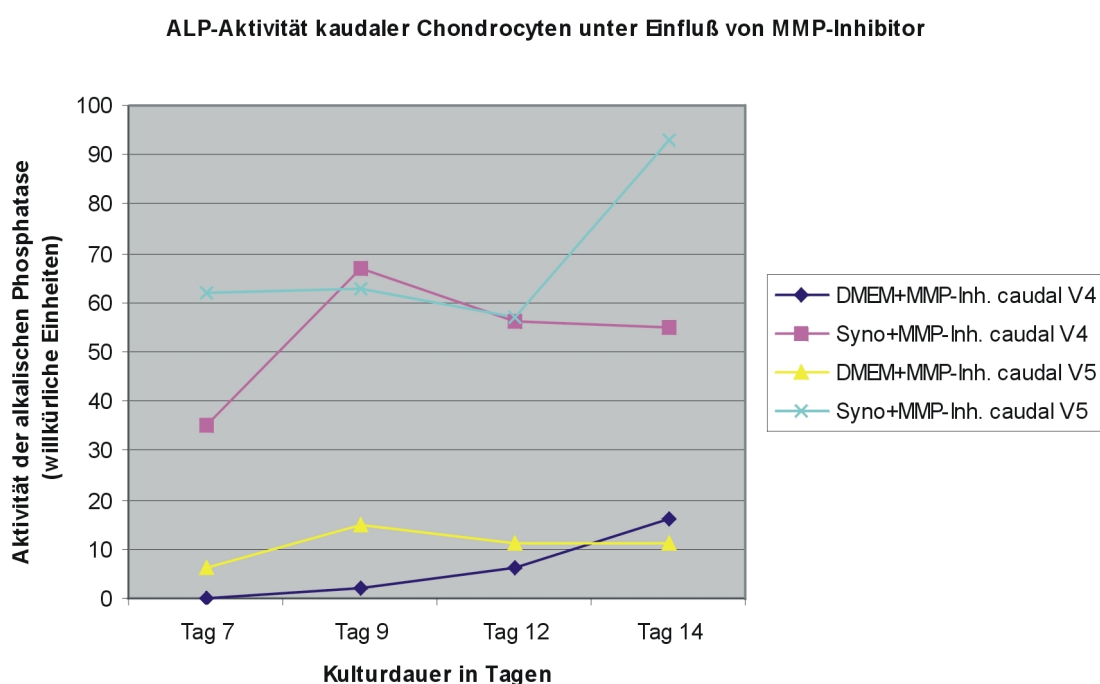
Wie die Versuche der kranialen Zellen, so lassen auch die Gelatine-Gele der kaudalen Zellen gelatinolytische Bande für pro MMP-9, MMP-9, pro MMP-2, MMP-2 und MMP-13 in den Synovialflüssigkeit vermuten. MMP-13 ist mittels Immunoblot in der Synovialflüssigkeit von Versuch 1 nachgewiesen worden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden auch den Proben mit kaudalen Chondrocyten MMP-Inhibitor beigefügt, um dessen Einfluß darzustellen. Es handelt sich um MMP-3-Inhibitor II, der neben MMP-3 auch andere MMPs, wie MMP-1, 2, 7, 8, 9, 13 und 14, inhibiert.

Die Proben mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor zeigen im Vergleich zu den Proben mit DMEM und MMP-Inhibitor eine klare Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Die Probe mit der Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor aus Versuch 5 steigt zwischen Tag 12 und Tag 14 sogar noch einmal signifikant an und macht den Unterschied zwischen den Proben mit DMEM und MMP-Inhibitor und den Proben mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor um so deutlicher.

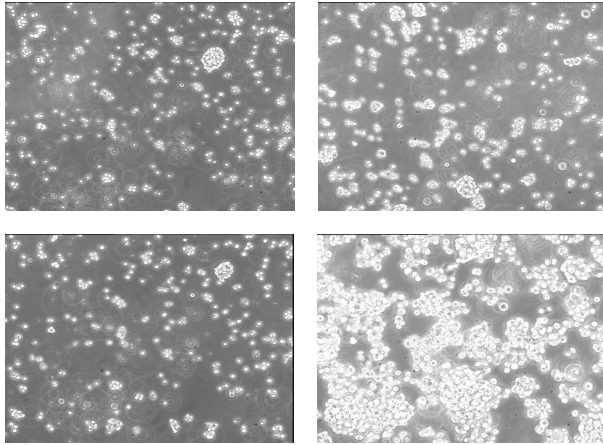
Die Proben mit DMEM und MMP-Inhibitor lassen über einen Zeitraum von 7 Tagen keine wichtige Steigerung in der Aktivität der alkalischen Phosphatase erkennen (Abbildung 54).



**Abb. 54. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten**

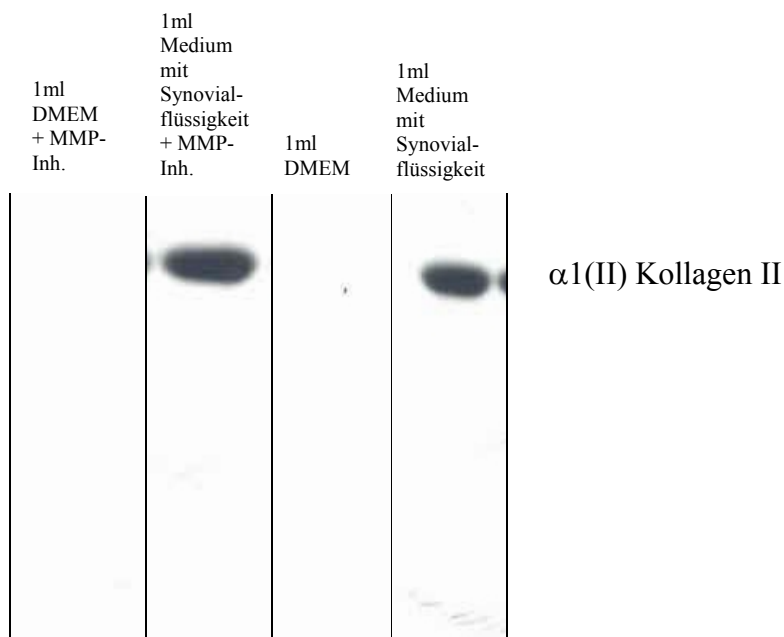
Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + MMP-Inhibitor und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + MMP-Inhibitor kultiviert.

Betrachtet man dazu die Photos von Versuch 5 (Abbildung 55), kann man eine Zunahme der Zellzahl und des Zellvolumens innerhalb von 12 Tagen bei den Proben mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor beobachten, während es bei den Proben mit DMEM und MMP-Inhibitor zu einer Abnahme der Zellzahl im beobachteten Probenabschnitt kommt.



**Abb. 55. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 5**

Li. oben: Kultur mit DMEM + MMP-Inh. am Tag 2 Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + MMP-Inh. am Tag 2  
 Li. unten: Kultur mit DMEM + MMP-Inh. am Tag 14 Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + MMP-Inh. am Tag 14



**Abb. 56 Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 5 zum Nachweis von Kollagen X**

Li.: Probe, in der kaudale Chondrocyten mit 1ml DMEM + MMP-Inh. über 14 Tage kultiviert wurde,  
 Re.: Probe mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + MMP-Inh. nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

Auch bei diesem Versuchsansatz läßt die Aktivität der alkalischen Phosphatase vermuten, daß eine Hypertrophie der kaudalen Zellen in den Proben mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor vorliegt, was jedoch das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels durch die fehlende Kollagen-X-Bande nicht bestätigen konnte



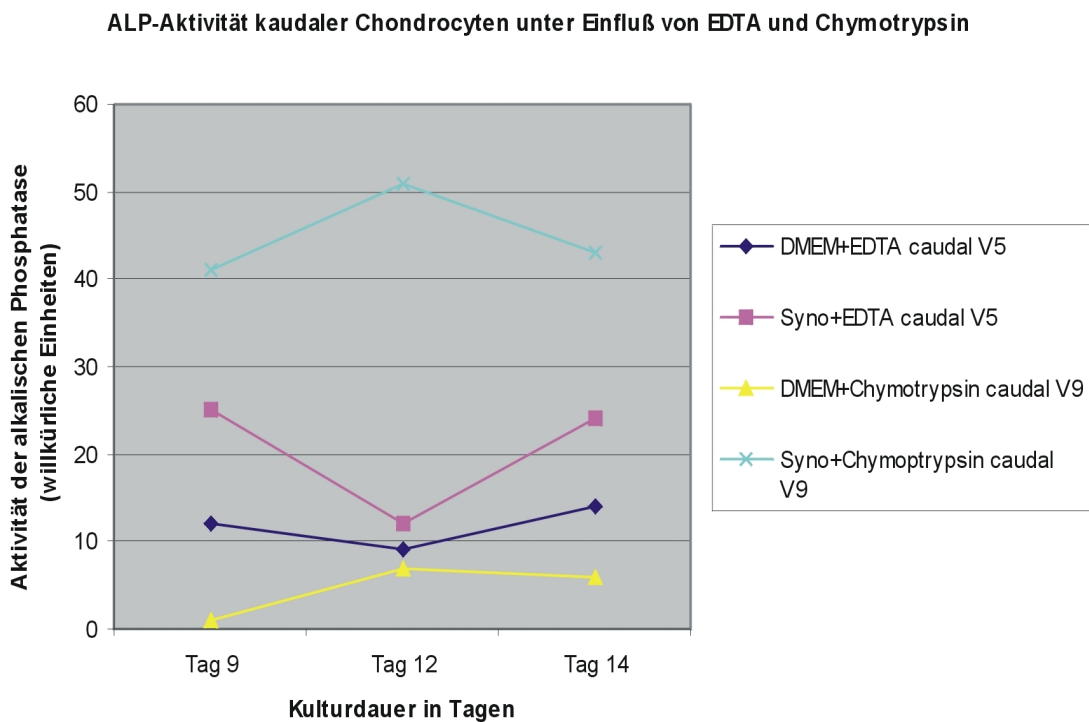
(Abbildung 56). Wie in den Versuchansätzen kaudaler Zellen zuvor ist auch hier nur eine Kollagen-II-Bande in der Probe mit Synovialflüssigkeit und MMP-Inhibitor zu erkennen

### 3.2.2.4 Komplexbildner und Endopeptidase

Auch hier wurden, wie bei den kranialen Chondrocyten, den Proben mit kaudalen Chondrozyten in einem weiteren Versuchansatz der Komplexbildner EDTA und in einem anderen Versuchansatz die Endopeptidase Chymotrypsin beigefügt.

Ethylendiamintetraessigsäure ist ein organischer Komplexbildner, der bevorzugt zweiwertige Kationen bindet.

In unserem Fall soll EDTA 2-wertige Kationen, wie z.B. Zink, binden, welches im aktiven Zentrum von MMP's vorkommt und deren Aktivität ermöglicht.



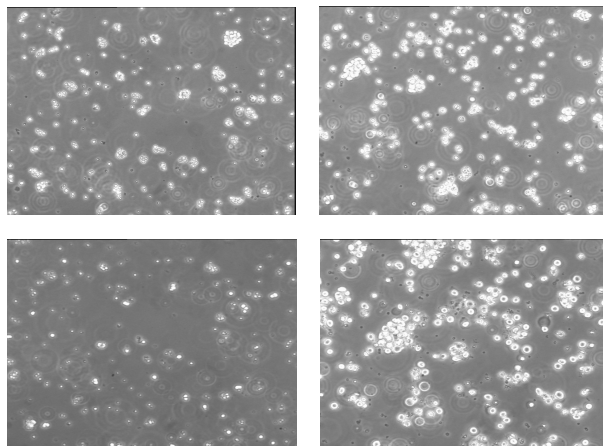
**Abb. 57. Aktivität der ALP im Medium kaudaler Chondrocyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit DMEM + EDTA und DMEM + Chymotrypsin und zum anderen mit Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + EDTA und Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + Chymotrypsin kultiviert

Chymotrypsin ist ein Verdauungsenzym, welches Peptidbindungen spaltet, deren Carbonylgruppe von einem Tyrosin-, Tryptophan- oder Phenylalaninrest stammt.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase läßt bei der Probe mit Synovialflüssigkeit und Chymotrypsin eine deutlich höhere Aktivität der ALP als in den anderen Proben erkennen.

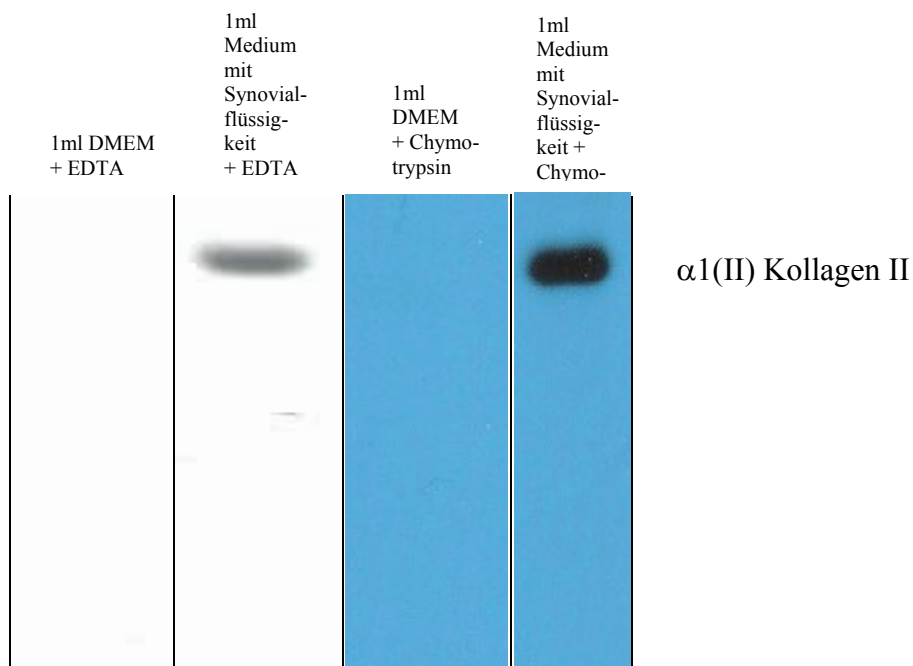
Die Proben mit DMEM und EDTA, DMEM und Chymotrypsin sowie Synovialflüssigkeit und EDTA zeigen über den Zeitraum von 5 Tagen keine markante Veränderung in der ALP-Aktivität, wobei die Aktivität der ALP insgesamt niedriger ist, als bei der Probe mit Synovialflüssigkeit und Chymotrypsin (Abbildung 57).



**Abb. 58. Photos kaudaler Chondrocyten aus Versuch 5.**

Li. oben: Kultur mit DMEM + EDTA am Tag 2    Re. oben: Kultur mit Synovialflüssigkeit + EDTA am Tag 2  
Li. unten: Kultur mit DMEM + EDTA am Tag 14    Re. unten: Kultur mit Synovialflüssigkeit + EDTA am Tag 14

Die Photos in Abbildung 58 zeigen Ausschnitte des Versuchansatzes mit EDTA. Links ist die Probe mit DMEM und EDTA zu sehen. Die Zellzahl hat zwischen Tag 2 und Tag 14 der Kulturdauer abgenommen, während links daneben die Probe mit Synovialflüssigkeit und EDTA eine geringe Zunahme der Zellzahl und des Zellvolumens innerhalb des Zeitraums erkennen läßt. Bei beiden Proben jedoch ist keine Bildung von extrazellulärer Matrix ersichtlich.



**Abb. 59. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 5 und 9 zum Nachweis von Kollagen X**  
 Li.: Proben, in der kaudale Chondrozyten zum einen mit 1ml DMEM + EDTA und zum anderen synovialflüssigkeitshaltigem Medium + EDTA über 14 Tage kultiviert wurden  
 Re.: Proben, die zum einen mit 1ml DMEM + Chymotrypsin und zum anderen mit 1ml synovialflüssigkeitshaltigem Medium + Chymotrypsin über 14 Tage kultiviert wurden

Die in Abbildung 59 dargestellten Fluorogramme der SDS-PAGE-Gele aus Versuch 5 und 9 weisen auch bei diesen Versuchsansätzen keine Kollagen-X-Banden als Marker für eine Hypertrophie auf. Chymotrypsin wurde nicht inaktiviert, was dann zu einem Abbau von Kollagen X durch Chymotrypsin geführt haben könnte.

### 3.3 T4 – ELISA der verschiedenen Synovialflüssigkeiten

Thyroxin (T4) wird von der Schilddrüse gebildet und unterliegt in seiner Sekretion der Steuerung durch Hypothalamus und Hypophyse.

Ein kleiner Teil dieses menschlichen Hormons kommt im Serum mit einer Konzentration von ca. 0,9-1,7ng/dl frei vor. Ein Großteil ist jedoch an Proteine gebunden und liegt so in einer Konzentration von ca. 5-14µg/dl im Serum vor.

### 3.3.1 T4-ELISA der late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten

T4 ist entscheidend für die normale Knochenentwicklung beim Menschen und hat dementsprechend auch einen wichtigen Einfluß auf die Wachstumsfuge. T4 bewirkt eine Chondrocytenproliferation und -differenzierung, eine Invasion von Knochenzellen und Blutgefäßen in die Wachstumsfuge und fördert das longitudinale Wachstum in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge (van der Eerden et al., 2003, Ola Nilsson et al., 2005).

Aufgrund des Einflusses, den T4 auf Chondrocyten ausübt, wurde ein T4-ELISA-Test mit den in den Versuchen benutzen Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten gemacht.

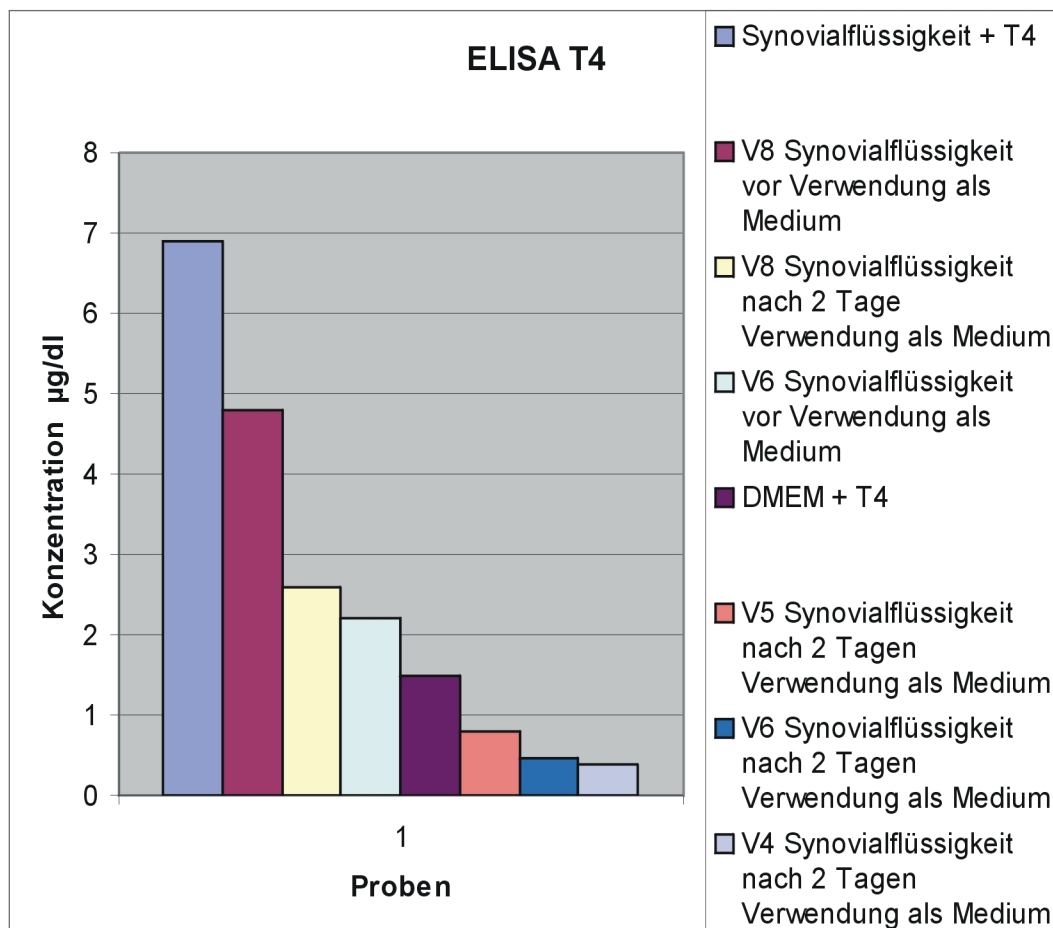


Abb. 60. T4-ELISA verschiedener late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten

Hierbei wurden verschiedene Synovialflüssigkeiten getestet, die zum Teil schon 2 Tage als Medium auf den Zellen benutzt wurden. In Versuch 8 wurde die Synovialflüssigkeit 1:5 mit DMEM verdünnt, in Versuch 6 1:7, in Versuch 5 1:5 und in Versuch 4 1:7.

Bei den Proben, in den T4 zugefügt worden sind, betrug die Menge an T4 2,5µg/dl.

Wie in Abbildung 60 gut zu erkennen ist, wiesen die Proben mit dem Medium, welches sich bereits zwei Tage auf den Zellen befunden hat, eine geringe Konzentration an T4 auf, als die verdünnte Synovialflüssigkeit bevor sie auf die Zellen gegeben wurden.

Die höchste Konzentration an T4 wies die Synovialflüssigkeit auf, der von außen noch mal 2,5µg/dl zugefügt wurde, im Vergleich dazu wies die Probe mit DMEM und 2,5 µg/dl T4 eine ca. 4,5 mal geringer Konzentration an T4 auf.

Die Synovialflüssigkeit aus Versuch 8 hat unverdünnt eine Konzentration von ca. 24 µg/dl und die Synovialflüssigkeit aus Versuch 6 hat unverdünnt eine Konzentration von ca. 15,4µg/dl. Damit liegen die Konzentrationen in beiden Synovialflüssigkeiten über dem Normwert für T4 im Serum, weisen zueinander aber auch einen deutlichen Unterschied von ca. 8µg/dl T4 auf.

### **3.3.2** *Einfluß von T4 und Proteasen auf die Chondrocyten-Spätendifferenzierung*

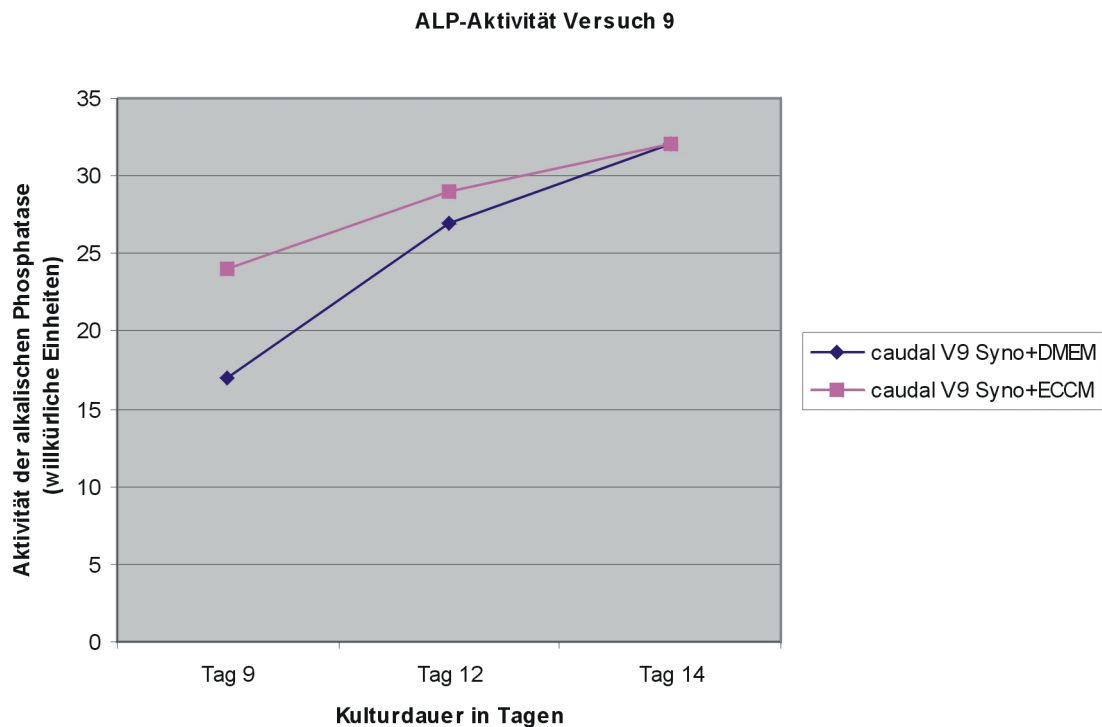
Aufgrund der Ergebnisse des T4-ELISA-Tests (siehe Kapitel 3.3.1.), der eine erhöhte Konzentration von T4 in der Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten erkennen ließ, wurde nun versucht, kaudale Zellen zur Hypertrophie zu bringen.

Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, kam es allein durch die Zugabe von Synovialflüssigkeiten und verschiedenen löslichen Faktoren nicht zu nachweisbaren Kollagen-X-Banden, die den Marker für eine Hypertrophie der kaudalen Zellen darstellen.

Katherina Bittner et al., 1998, konnten in ihrer Arbeit darlegen, daß konditioniertes Endothelzellmedium mit den darin vorhandenen Proteasen und T4 bei kaudalen Zellen eine Hypertrophie auslöst.

Nun soll dieser Versuchsansatz davon ausgehen, daß in der Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten genügend T4 vorhanden ist, um in Kombination mit konditioniertem Endothelzellmedium auch bei kaudalen Zellen eine Hypertrophie auszulösen.

Dazu wurden die kaudalen Zellen über 14 Tage zum einen mit 500µl Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + 500µl DMEM und zum anderen mit 500µl Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + 500µl ECCM kultiviert.



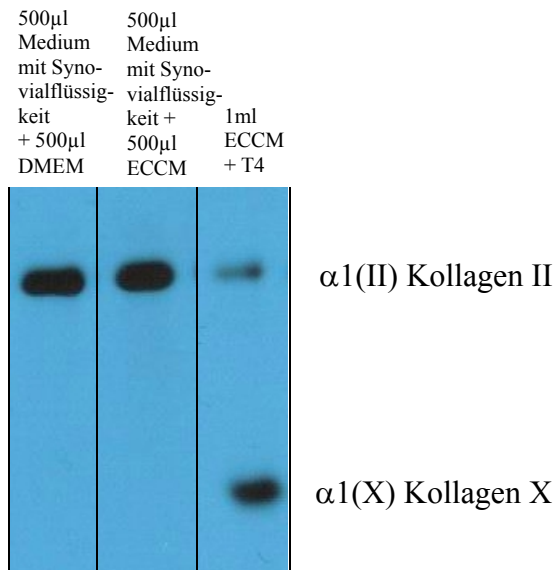
**Abb. 61. Aktivität der ALP im Medium caudaler Chondrozyten**

Die Zellen wurden 14 Tage zum einen mit 500µl Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + 500µl DMEM und zum anderen mit 500µl Synovialflüssigkeit in DMEM verdünnt + 500µl ECCM kultiviert.

Abbildung 61 zeigt die Aktivität der alkalischen Phosphatase dieser beiden Versuchsansätze.

Obwohl an Tag 9 der Kulturdauer zunächst ein Unterschied mit vermehrter Aktivität zugunsten der Probe mit Synovialflüssigkeit und ECCM abzeichnet, so ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase am Tag 14 der Kulturdauer bei beiden Versuchsansätzen gleich und liegt bei 32 willkürlichen Einheiten. Im Vergleich dazu lag die Positiv-Kontroll-Probe mit 1ml ECCM + T4 am Tag 14 der Kulturdauer bei 543 willkürlichen Einheiten.

Auch das Fluorogramm des SDS-PAGE-Gels (Abbildung 62) zeigt bei beiden Versuchsansätzen keine Kollagen-X-Banden als Hinweis auf eine Hypertrophie der kaudalen Zellen. Die Positiv-Kontroll-Probe hingegen zeigt eine eindeutige Kollagen-X-Bande, die konform mit dem Ergebnis aus der Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase ist.



**Abb. 62. Fluorogramme des SDS-PAGE-Gels von Versuch 9 zum Nachweis von Kollagen X**

Li.: Probe, in der kaudale Chondrozyten mit 500µl synovialflüssigkeitshaltigem Medium + 500µl DMEM 14 Tage kultiviert wurden  
 Mitte: Probe, die mit 500µl synovialflüssigkeitshaltigem Medium + 500µl ECCM über 14 Tage kultiviert wurde  
 Re. Probe, die mit 1ml ECCM + T4 14 Tage kultiviert wurde

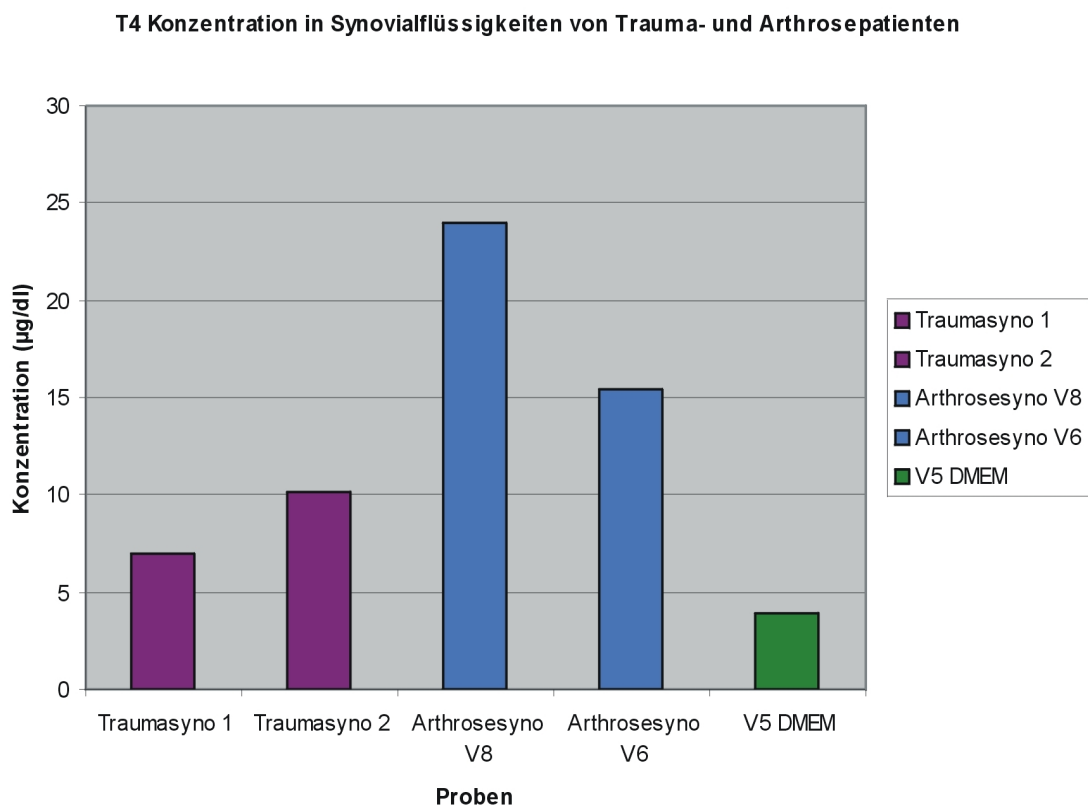
### 3.3.3 Vergleich der T4-ELISAs von late-stage Arthrose- und Trauma-Synovialflüssigkeiten

Die T4 Konzentration in der Synovialflüssigkeit von Knie-Traumapatienten liegt bei den untersuchten Synovialflüssigkeiten zwischen ca. 7 und 10µg/dl (Abbildung 63, lila gefärbte Balken) und überschreitet damit nicht die Normwerte für an Eiweiß gebundenes T4 im menschlichen Serum.

Im Gegensatz zu dem vorherigen T4-ELISA-Test (Kapitel 3.3.1.) sind die hier verwendeten Synovialflüssigkeiten, ob Trauma- oder Arthrosepatient, nicht verdünnt worden.

Betrachtet man nun die T4 Konzentrationen in den Proben mit den Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten, so erkennt man eine Konzentration von T4, die zwischen ca. 15 und 24 $\mu\text{g}/\text{dl}$  liegt (blau gefärbte Balken, Abbildung 63) und damit nicht mehr im Normbereich für das an Eiweiß gebundene T4 im menschlichen Serum liegt.

Vergleicht man also die Synovialflüssigkeit von Traumapatienten mit der Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten, so läßt sich im extremsten Fall ein Unterschied von ca. 17 $\mu\text{g}/\text{dl}$  feststellen.



**Abb. 63. T4-ELISA verschiedener late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten im Vergleich mit Synovialflüssigkeit von Traumapatienten**



Die enchondrale Ossifikation ist die Basis für die Entwicklung eines adulten humanen Skeletts. Die Röhrenknochen des skelettalen Stützgerüsts des Menschen werden zunächst knorpelig angelegt und dann im Laufe der Entwicklung über eine Reihe von Differenzierungsschritten knöchern umgebaut. Dieser Umbauprozess wird als enchondrale Ossifikation (siehe Kapitel 1.2.2.2) bezeichnet.

Während diese Differenzierungsschritte für die knöcherne Entwicklung essentiell sind, sind sie im Alter mitverantwortlich für die Entstehung einer der häufigsten Gelenkerkrankungen, der Osteoarthritis (Sokoloff, 1979). Bei dieser Erkrankung kommt es zum Verlust der knorpeligen Oberflächen der Gelenke und zum knöchernen Umbau, verbunden mit Schmerzen und Bewegungseinschränkungen bis hin zur Versteifung, auch Arthrodeese genannt.

Charakteristisch für die Osteoarthritis ist eine progressive Knorpeldegeneration, eine sekundäre Entzündung der Synovialmembran, Bildung von Osteophyten, sowie eine Zunahme der subchondralen Knochenmasse (Dieppe und Lohmander, 2005).

Im osteoarthrotischen Knorpel findet man sowohl Proliferation von Chondrocyten sowie Chondrocyten-Spät differenzierung, die sich durch biochemische Marker für die Hypertrophie (Kirsch et al., 2000; Pullig et al., 2000; Von der Mark et al., 1992) belegen läßt.

Somit könnte einer der Pathomechanismen der Arthritis der funktionelle Verlust der Mechanismen zur Inhibition der Chondrocyten-Spät differenzierung im Gelenkknorpel sein (Drissi et al., 2005).

*In vitro* können Knorpelreifungsprozesse am Modell des embryonalen Hühnersternums untersucht werden. Verschiedene lösliche Faktoren (Thyroxin, Insulin oder IGF-I) leiten in Zellkulturen sternaler Knorpelzellen die Differenzierung ein. Ab Tag 17 *in ovo* können im Hühnersternum kraniale und kaudale Chondrocyten hinsichtlich ihrer Differenzierungseigenschaften unterschieden werden (siehe Kapitel 1.5).

Während die kranialen Zellen bereits beginnen zu hypertrophieren, sind die kaudalen Zellen noch im Ruhestadium und produzieren keine Hypertrophiemarker, sie können sogar deren Expression in den kranialen Zellen in Kokultur verhindern (Böhme et al., 1992, Böhme et al., 1995).

#### **4.1 Kann Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten die Chondrocyten-Spätdifferenzierung auslösen?**

Für uns stellt sich jetzt die Frage, ob die Einleitung der Chondrocyten-Spätdifferenzierung auch durch Synovialflüssigkeiten von Patienten mit late-stage-Arthrose ausgelöst werden kann. Sind also in der Synovialflüssigkeiten von Arthrosepatienten Faktoren vorhanden, die die negative Regulation der Knorpeldifferenzierung in deren Gelenkknorpel ausschalten?

Hierzu wurden verschiedene Versuchsreihen mit kaudalen und kranialen Chondrocyten aus embryonalen Hühnersterna angelegt und mit verdünnter Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten kultiviert.

Bei der Auswahl der Synovialflüssigkeiten gab es zwei Kriterien, die zu Verwendung des jeweiligen Flüssigkeit hinreichend waren; einmal mußte es die Flüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten sein und zum anderen mußte ausreichend Flüssigkeit vorhanden sein, damit die Verdünnung für die Versuchsreihe nicht über 1:9 hinaus ging und dann eine ausreichende Menge für die gesamte Kulturdauer von 21 Tagen zur Verfügung stand. Kriterien wie Geschlecht, Alter oder Vorerkrankungen der Patienten wurden nicht unterschieden.

Die Negativ-Kontrolle bildeten Kulturen mit kaudalen und kranialen Chondrocyten, die mit DMEM kultiviert wurden.

Als Marker für die Hypertrophie wurden jeweils die Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie Kollagen X bestimmt. Außerdem wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen an bestimmten Tagen gefertigt, um auch morphologische Veränderungen darzustellen und festzuhalten.

#### 4.1.1 *Kraniale Chondrocyten*

Bei den kranialen Zellen waren bereits am 9.Tag der Kulturdauer signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen erkennbar (Abb. 12). Bei drei Versuchsansätzen, jeweils mit unterschiedlicher Synovialflüssigkeit, zeigt sich bereits am 9. Tag eine mehr als dreifach erhöhte ALP-Aktivität in den Versuchsansätzen mit der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu den Versuchsansätzen mit DMEM. Ebenfalls erkennbar ist aber auch ein Unterschied der ALP-Aktivität bei den drei verwendeten unterschiedlichen Synovialflüssigkeiten.

Der Unterschied in der ALP-Aktivität zwischen den einzelnen Synovialflüssigkeiten ist unter anderem dadurch zu erklären, daß hier unterschiedliche Faktoren, die noch nicht näher definiert bzw. detektiert sind, in unterschiedlichen Konzentrationen in den verschiedenen Synovialflüssigkeiten vorliegen könnten. Hier wäre z.B. zu diskutieren, ob eine aktivierte Arthrose, bzw. eine zusätzliche entzündliche Komponente zu einer höheren ALP-Aktivität führen könnte.

Jedoch zeigen alle drei Synovialflüssigkeiten eine signifikante Erhöhung der ALP-Aktivität um mindestens den Faktor 3 im Vergleich zu den Versuchsansätzen mit DMEM.

Konform dazu zeigen die Fluorogramme (Abb.14), der schon erwähnten Versuchsansätze, eine deutliche Expression von Kollagen X als Marker einer Hypertrophie der kranialen Chondrocyten, während in den Versuchsansätzen mit DMEM keine Kollagen-X-Expression nachgewiesen werden konnte. Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 13) zeigen, daß die kranialen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, proliferiert und hypertrophiert sind. Deutlich werden die Zunahme der Zellzahl und die zellnahe Bildung von extrazellulärer Matrix. Somit kann man davon ausgehen, daß es in der Synovialflüssigkeit Faktoren gibt, die die Spätdifferenzierung der Chondrocyten auslösen können, was dann zur Gewebedestruktion und letztendlich zum Verlust der Gelenkfunktion führen kann.

Könnte man nun diese Faktoren in der Synovialflüssigkeit, deren Substrate sowie deren Aktivierungsmechanismus näher charakterisieren, wäre es möglich, diese zu inhibieren. Man hätte mit der Inhibierung dieser Faktoren einen weiteren Ansatz in der Therapie der Arthrose gefunden.

#### **4.1.2**      *Kaudale Chondrocyten*

Auch bei den kaudalen Chondrocyten ist eine erhöhte ALP-Aktivität in den Versuchansätzen mit Synovialflüssigkeit zu erkennen (Abb. 15), die teilweise um ein Achtfaches höher lag, als in den Versuchansätzen mit DMEM.

Vergleicht man jedoch die ALP-Aktivität der kranialen und kaudalen Zellen, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, miteinander, kann festgestellt werden, daß die ALP-Aktivität der kranialen Zellen höher liegt, als die der kaudalen Zellen (Abb.12 und Abb.15), obwohl die Zellen mit der gleichen Synovialflüssigkeit kultiviert wurden (Synovialflüssigkeit aus Versuch 4 und 5). Eventuell ist das Ausmaß der Hypertrophieauslösung in den kaudalen Zellen geringer als bei kranialen Zellen.

Auf den Fluorogrammen zu den Versuchsreihen mit kaudalen Zellen findet sich jedoch keine Kollagen-X-Expression (Abb. 17). Auf den dazu angefertigten Fotos (Abb. 16) ist zu erkennen, daß es in den Versuchansätzen mit Synovialflüssigkeit zu einer Proliferation und zu einer Zunahme der Zellgröße gekommen ist, eine ausgeprägte Bildung von extrazellulärer Matrix wie bei den kranialen Zellen erkennbar, findet bei den kaudalen Zellen nicht statt.

Jedoch lassen die gestiegene ALP-Aktivität und die Proliferation mit Größenzunahme der Zellen darauf schließen, daß sich die Zellen hier in der frühen Stufe der Chondrocyten-Spätendifferenzierung, der Proliferationsphase oder der prähypertrophen Phase (Cancedda et al., 1995), befinden.

Eventuell ist die Zeitdauer der Kultur ein entscheidender Faktor für die Einleitung der Hypertrophie. Es stellt sich somit die folgende Frage:

Brauchen kaudale Zellen einfach nur mehr Zeit, ehe sie unter Einfluss von Synovialflüssigkeit Kollagen X synthetisieren? Zur Klärung diene der nachfolgende Versuchsansatz.

#### **4.1.3**      *Kaudale Condrocyten mit einer Kulturdauer von 21 Tagen*

Auch die Kultivierung von kaudalen Zellen mit Synovialflüssigkeit über einen Zeitraum von 21 Tagen statt 14 Tage, führte nicht zur Expression von Kollagen X, die im Fluorogramm (Abb.20) nachweisbar ist.

Als Positiv-Kontrolle dienten Kulturen kaudaler Zellen, die durch Zugabe von Thyroxin und Endothelzellmedium zur Hypertrophie stimuliert wurden. Diese wiesen nach 14 Tagen im Fluorogramm eine Kollagen-X-Bande (Abb. 20) auf.

Vergleicht man die ALP-Aktivität der Synovialflüssigkeitansätze mit den DMEM-Ansätzen, kann man hier kaum einen Unterschied in der ALP-Aktivität zwischen diesen beiden Ansätzen erkennen (Abb. 18).

Als Erklärung dafür könnte man anführen, daß, wie schon erwähnt, Synovialflüssigkeiten verschiedener Patienten für die Versuchansätze benutzt wurden, die auch, verglichen miteinander, unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen in der ALP-Aktivität, in der Zellproliferation und in der Kollagenexpression der Zellen erkennen ließen.

Jedoch zeigen die mikroskopisch gefertigten Aufnahmen der kaudalen Chondrocyten auch hier in den Versuchansätzen mit Synovialflüssigkeit eine Größenzunahme und Proliferation (Abb.19).

Es kommt zu einer Proliferation der kaudalen Zellen, ohne Nachweis des Hypertrophiemarkers, oder einer signifikanten ALP-Aktivitätssteigerung im Vergleich zu den Ansätzen mit DMEM.

Es ist davon auszugehen, daß zumindest ein Faktor in der Synovialflüssigkeit die Proliferation der Chondrocyten auslöst, ohne daß diese Proliferation jedoch in dem beobachteten Zeitraum von 21 Tagen zu einer Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten geführt hat. Hier steht die Überlegung an, ob Faktoren der Synovialflüssigkeit die kaudalen Chondrocyten zwar soweit stimuliert, daß es zu einer Proliferation kommt, die kaudalen Chondrocyten aber dann ihrerseits Signalmoleküle ausscheiden, die den weiteren Fortlauf des Prozess der enchondralen Ossifikation inhibieren. Dieser Theorieansatz erscheint nicht abwegig, wenn man sich vor Augen hält, das der Übergang von der proliferativen zur hypertrophen Phase bei Chondrocyten in der Wachstumsfuge durch PTHrP unterdrückt wird, dessen Synthese von prähypertrophen Chondrocyten gesteuert wird (Vortkamp et al., 1996).

Ebenfalls unterstützen diesen Theorieansatz die Ergebnisse von Barbarina et al., 2001, die gezeigt haben, daß TGF- $\beta$  und FGF-2 gemeinsam in einem Kulturansatz die Hypertrophie blockieren, FGF-2 jedoch ohne TGF- $\beta$  die Hypertrophie der kaudalen und kranialen Chondrocyten verstärkt. Der negative Einfluß von TGF- $\beta$  auf die

Chondrocyten-Spättdifferenzierung kann also durch FGF-2 nicht überwunden werden kann.

Aufgrund der fehlenden Expression von Kollagen X in den Versuchsansätzen mit kaudalen Chondrocyten, kann davon ausgegangen werden, daß die Synovialflüssigkeit, im beobachteten Zeitraum, bei kaudalen Zellen eine Proliferation, jedoch keine Hypertrophie auslöst.

## **4.2 Einfluß löslicher Faktoren auf die Chondrocyten-Spättdifferenzierung**

Da die Synovialflüssigkeiten von Arthrosepatienten bei den kranialen Zellen eine Hypertrophie auslösten und bei den kaudalen Zellen zumindest eine Proliferation bewirkten, stellt sich nun die Frage, welche Faktoren, ob nun zelluläre oder humorale Umgebungssignale, für diesen Prozess verantwortlich sein könnten. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob das Hinzufügen bestimmter löslicher Faktoren die zuvor erbrachten Ergebnisse (Kapitel 3.1) beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden den Kulturen mit sternalen Chondrocyten sowohl stimulierende als auch inhibierende lösliche Faktoren zugefügt. Zu den stimulierenden Faktoren gehören Thyroxin (T4) und IGF-I (insulin-like growth factor) und Proteasen. Zu den inhibierenden Faktoren gehören der Hydroxamatinhibitor MMP-3-Inhibitor II, der verschiedene Matrix-Metalloproteinasen hemmt, der Komplexbildner EDTA sowie verschiedene andere Protease-Inhibitoren.

### **4.2.1 *Thyroxin, T4***

Ein Mangel an Thyroxin (T4) führt zu einem retardierten Wachstum in der Epiphysenfuge sowie einer Einschränkung der enchondralen Ossifikation, während ein Hyperthyreoidismus beide Prozesse beschleunigt und steigert (Van der Eerden et al., 2003). Zudem haben Untersuchungen gezeigt, daß es bei einem Hypothyreoidismus zu einer Abnahme in der Höhe der Proliferationszone und der Resorptionszone in Wachstumsfugen kommt, die Anzahl der proliferierten und hypertrophen Chondrocyten sinkt und die vaskuläre Invasion ist eingeschränkt (Nilsson et al., 2005).

Die Ergebnisse der Kultivierung mit T4 (Kapitel 3.2.1.1 und Kapitel 3.2.2.1) zeigen keine signifikante Änderung in der Expression des Hypertrophiemarkers Kollagen X im Vergleich zu den Kulturen, die allein mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden. Die kranialen Chondrocyten zeigen weiterhin Hypertrophie bei Kultivierung mit Synovialflüssigkeit und T4. Während man mit konditioniertem Endothelzellmedium und T4 eine Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten beobachten kann (Bittner et al., 1998), zeigt sich bei einer Kokultivierung mit T4 und Synovialflüssigkeit eine Proliferation, jedoch keine Hypertrophie der kaudalen Zellen, wie auch schon bei alleiniger Kultivierung mit Synovialflüssigkeit.

Die ALP-Aktivität der kaudalen Zellen liegt (Abb. 43) im Vergleich mit der ALP-Aktivität bei alleiniger Kultivierung mit Synovialflüssigkeit (Abb.15) deutlich höher.

Trotz der des Anstiegs der ALP-Aktivität bei den kaudalen Zellen zeigen diese unter Einfluß von T4 und Synovialflüssigkeit keine Kollagen-X-Expression. Während im Endothelzellmedium verschiedene Proteasen, die in Proteasenkaskaden agieren, für das Einleiten der zweiten Stufe, der Hypertrophie, verantwortlich sind (Bittner et al., 1997), scheinen diese Proteasen in der Synovialflüssigkeit zu fehlen oder durch weitere Faktoren inaktiviert zu werden. Insgesamt ist das Verhältnis von aktiven Proteasen und deren Inhibitoren (z.B. für die MMPs die TIMPs) entscheidend, die ebenfalls in Synovialflüssigkeiten vorhanden sind. Liegen ausreichend Inhibitoren vor, ist die Aktivität der Proteasen nicht ausreichend, um Differenzierungsvorgänge in kaudalen Chondrocyten einzuleiten.

#### **4.2.2**      *IGF-I (Insulin-like growth factor-I)*

IGF-I wird von diversen Zellen im Körper produziert, unter ihnen auch Zellen des Knochenmarks, Osteoblasten und von Chondrocyten selbst (Andrew, Hoyland et al., 1993; Hayden, Mohan et al., 1995). IGF-I wird außerdem aber vor allem in der Leber gebildet und von dort relativ konstant freigesetzt. Die Halbwertszeit von ungefähr 8 Stunden wird hauptsächlich aufgrund von Bindungsproteinen gewährleistet. Ähnlich wie T4 kann IGF-I die Zellproliferation fördern und eine Hypertrophie der kranialen Chondrocyten auslösen.

So ist es nicht überraschend, daß auch eine deutliche ALP-Aktivitätssteigerung sowohl bei den kranialen als auch kaudalen Chondrocyten die mit Synovialflüssigkeit und IGF-I kultiviert wurden (Kapitel 3.2.1.2 und Kapitel 3.2.2.2), erkennbar ist (Abb. 27 und 47). Auch im Vergleich zu den kaudalen und kranialen Chondrocyten, die alleinig mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, zeichnet sich eine signifikante Erhöhung der ALP-Aktivität ab. Auch stellt sich, insbesondere bei den kaudalen Chondrocyten, eine Zellproliferation unter IGF-I-Einfluss dar.

Wie aber auch schon in Versuchansätzen mit Thyroxin wird der Hypertrophiemarker Kollagen X nur in den Versuchansätzen mit kranialen Chondrocyten, Synovialflüssigkeit und IGF-I exprimiert.

In den Versuchansätzen kaudaler Chondrocyten mit Synovialflüssigkeit und IGF-I zeigt sich zwar eine deutliche ALP-Aktivitätserhöhung und eine Zunahme der Zellzahl ohne deutlich nachweisbare Bildung von zellnaher extrazellulärer Matrix, aber keine Expression von Kollagen X. Hier könnte bei den kaudalen Chondrocyten, neben den schon in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Gründen, eine geringere Anzahl oder Blockierung der IGF-I-Rezeptoren auf der Oberfläche der kaudalen Chondrocyten vorliegen.

Schaut man sich Ergebnisse vorangegangener Arbeiten an (Böhme, 1995; Bittner, 1997) scheint Thyroxin ein stärker hypertrophiefördernder Faktor zu sein als IGF-I. Diese Behauptung wird durch Vergleich der ALP-Aktivitäten in der vorliegenden Arbeit gestützt. Auch hier ist eine im Vergleich deutlich höhere ALP-Aktivität in den Versuchansätzen mit T4 erkennbar.

### **4.2.3**      *MMP-3-Inhibitor II*

Während der enchondralen Ossifikation wird der weitestgehend avaskuläre Knorpel knöchern umgebaut, was mit einer starken Vaskularisierung einhergeht. Unterbindet man die Blutzufuhr zum subchondralen Knochen, findet die Spätdifferenzierungskaskade nicht statt (Treuta und Morgan, 1960; Treuta und Little, 1960), so kann man davon ausgehen, daß an der enchondralen Ossifikation Signalfaktoren des Blutgefäßsystems beteiligt sind. Damit es zu einer Vaskularisation aus dem subchondralen Knochen kommen kann, wird die zuvor produzierte extrazelluläre Matrix



durch matrixabbauende Enzyme, unter anderem Matrixmetalloproteasen (MMPs), abgebaut.

Mäuse, denen MMP-9 fehlt zeigen eine eingeschränkte Vaskularisierung mit verlängerter hypertropher Zone (Vu et al., 1998). Fehlt zu MMP-9 auch noch MMP-13 zeigt sich eine noch stärker verlängerte hypertrophe Zone, was darauf schließen läßt, daß MMP-9 und MMP-13 synergistisch agieren (Stickens et al., 2004).

Mittels Zymographie der benutzen Synovialflüssigkeiten kann anhand gelatinolytischer und caseinolytischer Banden beobachtet werden, daß sich pro MMP-9, MMP 9, pro MMP-2, MMP-2 und MMP 13 in den Synovialflüssigkeiten befanden. MMP-13 ist in der Synovialflüssigkeit von Versuch 1 zusätzlich mittels Immunoblot nachgewiesen worden.

Mittels MMP-3-Inhibitor II, der neben MMP-3 auch andere MMPs wie MMP-1, 2, 7, 8, 9, 13 und 14 inhibiert, sollte in den Versuchsansätzen geklärt werden, ob die Inhibierung der MMPs die durch Synovialflüssigkeit ausgelöste Hypertrophie bei den kranialen Zellen stoppt.

Wie schon bei den zuvor beschriebenen Versuchsansätzen zeigt sich auch hier bei den kranialen Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit und MMP-3-Inhibitor kultiviert wurden, eine deutliche Expression von Kollagen X, während es bei den kaudalen Chondrocyten erneut nur zu einer Proliferation, jedoch nicht zu einer Hypertrophie gekommen ist.

Hier ist jedoch anzumerken, daß, anderes als in den Versuchsansätzen mit Thyroxin und IGF-I, die ALP-Aktivität in den Kulturansätzen mit Synovialflüssigkeit erhöht ist, aber es diesmal keinen nennwerten ALP-Aktivitätsunterschied zwischen kaudalen und kranialen Chondrocyten gibt.

Obwohl die Zymogramme für das Vorliegen von verschiedenen MMPs und pro MMPs spricht, zeigt das Hinzufügen des MMP-3-Inhibitor II keinen Einfluß auf die Hypertrophie der kranialen Chondrocyten oder die Proliferation der kaudalen Chondrocyten. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß die Matrixmetalloproteasen in der Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten zwar vorhanden sind, jedoch für die Hypertrophie allenfalls von geringer Bedeutung sind. Erst zu einem späteren Zeitpunkt, in der dritten und letzten Phase der enchondralen Ossifikation, wenn zur Einsprießung von kleinen Blutgefäßen in das

schon hypertrophierte Knorpelgewebe und zur Knochenbildung kommt (Roach et al., 1995; Provot und Schipani, 2005), scheinen die MMPs wieder an Bedeutung zu gewinnen, da sie beim dafür notwendigen Matrixab- und -umbau beteiligt sind.

#### **4.2.4**      *Protease-Inhibitoren*

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur Inhibitoren für Matrixmetalloproteasen auf ihre Wirkung auf die Chondrocyten-Spätendifferenzierung unter Einfluß von Synovialflüssigkeit untersucht. Es wurden auch verschiedene andere Protease-Inhibitoren in den Versuchsansätzen benutzt.

Proteasen können auf verschiedene Art und Weise in die Differenzierung der Chondrocyten eingreifen. Es können löslich Faktoren oder Hormone, die für die Hemmung der Spätendifferenzierung verantwortlich sind, durch Proteasen entweder proteolytisch degradiert werden oder durch Prozessierung aktiviert werden (Piek et al., 1999). Es können jedoch nicht nur löslich Faktoren von Proteasen verändert werden, sondern auch deren Rezeptoren durch Proteasen aktiviert (Coughlin, 1999), prozessiert oder proteolytisch abgebaut werden (Rose-John und Heinrich, 1994).

Da bei den kaudalen Chondrocyten bei Kultivierung mit Synovialflüssigkeit kein Kollagen X nachgewiesen werden konnte, wurden nur kraniale Chondrocyten mit Synovialflüssigkeit und Proteaseinhibitoren kultiviert, um die Auswirkung auf die Kollagen-X-Expression zu untersuchen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proteasehemmern handelt es sich um Leupeptin, einem Serin- und Thiolprotease-Inhibitor, um Pepstatin, einem Pepsin- und Aspartat-Inhibitor, um E64, einem irreversiblen Cystein-Protease-Hemmer und um Aprotinin, einem Trypsin-Inhibitor.

Die ALP-Aktivitäten in den Versuchsansätzen mit Leupeptin, Pepstatin und Synovialflüssigkeit zeigen, daß es auch hier im Vergleich zur Probe mit DMEM zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung gekommen ist. Auch zeigen die mikroskopisch gefertigten Aufnahmen extrazelluläre Matrix, die sich wie ein Halo um die Zellen gelegt hat. Die Expression von Kollagen X in beiden Versuchsansätzen bestätigt letztendlich, daß das Hinzufügen von Leupeptin und Pepstatin zur Synovialflüssigkeit keinen nennenswerten Einfluß auf die Expression von Kollagen X hatte (Kapitel 3.2.1.4).

Betrachtet man den Versuchansatz mit den Protease-Inhibitoren E64, Aprotinin und Synovialflüssigkeit ist, wie bei den Versuchsansätzen mit DMEM, eine ALP-Aktivitätsabnahme zu beobachten. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen zwar, ähnlich den Aufnahmen kaudaler Chondrocyten, die mit Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, eine Zellzahl- und Größenzunahme, aber keine ausgeprägte zellnahe extrazelluläre Matrix. Wie diese Ergebnisse schon vermuten lassen, zeigt sich auch keine Kollagen-X-Expression im Fluorogramm. Vergleich man das jedoch mit dem Versuchansatz in dem nur die Synovialflüssigkeit, die auch in den Ansätzen mit E64 und Aprotinin benutzt wurde, zeigt sich auch hier keine Kollagen-X-Expression. In diesem Versuch ist am ehesten die Synovialflüssigkeit für die fehlende Kollagen-X-Bildung verantwortlich. Wie schon anfangs erwähnt, waren die Auswahlkriterien für die Synovialflüssigkeit einfach gewählt:

1. die Synovialflüssigkeit mußte von einem late-stage Arthrose-Patienten stammen
2. es mußte genügend Synovialflüssigkeit für die Kultivierung über max. 21 Tage zur Verfügung stehen und durfte die Verdünnung von 1:9 nicht überschreiten

Diese Kriterien lassen natürlich außer Acht, daß es Unterschiede zwischen den Synovialflüssigkeiten geben kann, die nicht in diese Auswahlkriterien miteinbezogen wurden. Diese Unterschiede, z.B. fehlende entzündliche Komponenten, könnten ein Grund für die fehlende Kollagen-X-Expression in den Versuchsansätzen mit dieser Synovialflüssigkeit sein. Somit ist festzuhalten, daß nicht alle Synovialflüssigkeiten differenzierungsfördernde Aktivität in ausreichenden Konzentrationen beinhalten.

#### **4.2.5**      *Komplexbildner*

Sowohl kraniale als auch kaudale Chondrocyten wurden in der vorliegenden Arbeit mit Synovialflüssigkeit und EDTA kultiviert. Bei EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) handelt sich um ein Anion, das sich sechsfach, über zwei Stickstoffatome und 4 Carboxylgruppen, an ein Kation binden kann. Es bindet Schwermetallionen, die ihrerseits Enzyme hemmen könnten. EDTA bindet auch an Kationen innerhalb des Aktivzentrums von Matrixmetallproteasen und inaktiviert diese damit.

Bei den kranialen Chondrocyten zeigt sich diesmal nur eine kleine ALP-Aktivitätserhöhung in den Versuchsansätzen mit Synovialflüssigkeit und EDTA im

Vergleich zu den Versuchansätzen mit DMEM und EDTA. Doch schon bei den mikroskopisch gefertigten Aufnahmen ist erkennbar, daß es zur Bildung von extrazellulärer Matrix mit Zellzahlvermehrung gekommen ist. Auch das Fluorogramm zeigt eine deutliche Kollagen-X-Bande als Ausdruck einer Hypertrophie der kranialen Chondrocyten in den Versuchansätzen mit EDTA und Synovialflüssigkeit (Kapitel 3.2.1.4.3). Wie schon zuvor in Kapitel 4.2.3 erörtert, kann man vermuten, daß die Matrixmetalloproteasen erst zu einem späteren Zeitpunkt der enchondralen Ossifikation, während der vaskulären Einsproßung und trabekulären Knochenbildung (Descalzi-Cancedda et al., 1992; Roach et al., 1995; Provot und Schipani, 2005), an Bedeutung gewinnen und während der Hypertrophie eher eine untergeordnete Rolle spielen. Die Hemmung der MMPs über Komplexbildung hat also in der vorliegenden Arbeit zum betrachteten Zeitpunkt keine signifikante Auswirkung auf die Kollagen-X-Expression. In den Versuchsansätzen mit kaudalen Chondrocyten, Synovialflüssigkeit und EDTA zeigt sich im Vergleich zu den Versuchsansätzen mit DMEM und EDTA Zellproliferation. Jedoch stellt sich auch hier im Fluorogramm keine Kollagen-X-Bande dar.

#### **4.2.6**      *Endopeptidase*

Wie in vorherigen Arbeiten belegt, produzieren kaudale Sternumchondrocyten hypertrophie-inhibierende lösliche Faktoren (Böhme et al., 1992, Böhme et al., 1995). Chymotrypsin könnte mit seinem breiten Spektrum an Substraten sowohl den hypertrophiehemmenden Faktor, als auch involvierte Rezeptoren proteolytisch so modifizieren, daß die Hypertrophieblockade aufgehoben wird. Ebenso könnte Chymotrypsin die in der Synovialflüssigkeit für die Hypertrophie verantwortlichen Faktoren proteolytisch so verändern, daß die Hypertrophieblockade der caudalen Zellen zwar aufgehoben wird, jedoch die hypertrophieauslösenden Faktoren in der Synovialflüssigkeit nicht mehr wirken können.

Konform zu dieser These sind die Ergebnisse der Versuchsansätze mit kaudalen Chondrocyten, Synovialflüssigkeit und Chymotrypsin.

Trotz der Kultivierung mit Chymotrypsin ist weder eine signifikante ALP-Aktivitätssteigerung noch eine Kollagen-X-Expression in den Versuchsansätzen mit Synovialflüssigkeit und kaudalen Chondrocyten erkennbar.

### **4.3 Einfluß von Thyroxin aus Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten auf die Differenzierung von Chondrocyten**

Es liegt die Vermutung nahe, daß nicht nur Proteasen sondern auch Hormone, wie z.B. das Thyroxin, daß ja während der Knochenentwicklung des Menschen eine erhebliche Rolle spielt, in der Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten erhöht sein könnte.

Um dies nachweisen zu können, wurde ein T4-ELISA der verschiedene Synovialflüssigkeiten vorgenommen. Natürlich wurden hierbei die verschiedenen Verdünnungsfaktoren beachtet, sowie die Tatsache, daß einige der Proben bereits zwei Tag als Medium auf den Chondrocyten verwendet wurden, so daß es möglich ist, daß ein Teil des T4 in die Zellen aufgenommen wurde und nun nicht mehr messbar ist.

Der Normwert für Thyroxin im humanen Serum liegt bei 5-14µg/dl. Die gemessenen Werte zeigen zwischen den verschiedenen Synovialflüssigkeiten deutliche Unterschiede. In einigen Synovialflüssigkeiten liegen die Konzentration für T4 mit 24 µg/dl deutlich oberhalb der Normwerte für humanes Serum, andere Synovialflüssigkeiten wiederum zeigen Konzentrationswerte von T4, die im Normbereich liegen (siehe Kapitel 3.3.1). Eine Erklärung für die fehlende Kollagen-Expression in den Versuchansätzen mit kranialen Chondrocyten, Synovialflüssigkeit, E64 und Aprotinin könnten somit eine erniedrigte T4-Konzentrationen in der verwendeten Synovialflüssigkeit im Vergleich zu anderen Synovialflüssigkeiten sein.

Vergleicht man die T4 Konzentrationen in den Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten mit der Synovialflüssigkeit von Traumapatienten (Kapitel 3.3.3) stellt sich auch hier ein deutlicher Unterschied dar. Erkennbar wird eine Erhöhung der T4 Konzentration in den late-stage Arthrose-Synovialflüssigkeiten, während die T4-Konzentration in den Trauma-Synovialflüssigkeiten im Normbereich für humanes Serum bleiben. Die Synovialflüssigkeit wird von der Membrana synovialis des Gelenks gebildet, die stark vaskularisiert ist. Eine Möglichkeit der Erklärung wäre, daß es zum

Beispiel durch Mikrotraumen zu vaskulären Defekten in dieser Membran kommt. Diese könnten zum Austritt von Blutbestandteilen, unter anderem auch T4 in die Synovialflüssigkeit führen. Findet dies über einen längeren Zeitraum statt, könnte das eine Erhöhung der T4-Konzentration in der Synovialflüssigkeit zur Folge haben. Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgte ein Versuchsansatz, in dem konditioniertes Endothelzellmedium und Synovialflüssigkeit im Verhältnis 50:50 gemischt wurde. Da in vorangegangenen Arbeiten (Bittner et al., 1998) dargelegt wurde, daß konditioniertes Endothelzellmedium und T4 bei kaudalen Chondrocyten eine Hypertrophie auslöst, sollte diese Kombination von Synovialflüssigkeit mit der erhöhten T4-Konzentration und Endothelzellmedium mit Proteasen bei kaudalen Chondrocyten zu einer Hypertrophie führen (Kapitel 3.3.2).

Aber auch hier zeigt sich im Vergleich zum Versuchsansatz mit DMEM keine signifikante ALP-Aktivitätssteigerung oder eine Kollagen-X-Bande auf dem Fluorogramm.

Als Erklärung für die fehlende Hypertrophie trotz der erhöhten T4 Konzentration in der Synovialflüssigkeit und dem Vorhandensein von Proteasen aus konditioniertem Endothelzellmedium könnte man anführen, daß entweder das T4 durch Bindung an Proteine, z.B. an Globulinen, seine Wirkung nicht mehr ausüben kann oder die Rezeptoren für T4 durch in der Synovialflüssigkeit vorkommende Proteasen proteolytisch modifiziert wurden, oder daß die Menge von einem 500µl Endothelzellmedium mit den darin vorhanden Proteasen nicht ausreichend war, um mit der Menge an T4 aus der Synovialflüssigkeit eine Hypertrophie der kaudalen Chondrocyten auszulösen. Eventuell war auch in der verwendeten Synovialflüssigkeit die Konzentration von Proteaseinhibitoren ausreichend, um die Wirkung der Endothelzellproteasen zu inhibieren.

## 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit zeigen auf, daß die Synovialflüssigkeit von late-stage Arthrosepatienten bei kranialen Chondrocyten eine Hypertrophie auslöst und damit die zweite Phase der enchondralen Ossifikation (Cancedda et al., 1995) erreicht wird. Bei weniger hypertrophiekompetenten Zellen, wie den kaudalen Chondrocyten, wird eine Proliferation (Cancedda et al., 1995) nach der Kultivierung mit Synovialflüssigkeit beobachtet, es wird jedoch keine Hypertrophie ausgelöst. Auch eine längere Kultivierungsdauer von 21 Tagen oder die Kultivierung mit Chymotrypsin führen nicht zur Differenzierung in den hypertrophen Zustand, der mit Kollagen-X-Expression einhergeht.

An dieser Stelle wäre zu prüfen, welcher löslich Faktor, den die kaudalen Chondrocyten selbst produzieren, die Chondrocyten-Spät differenzierung inhibiert und sogar die Differenzierung der kranialen Chondrocyten verhindert (Böhme et al., 1992, Böhme et al., 1995). Ist dieser Faktor gefunden, wäre zu überlegen, ob dieser Faktor auch in vivo bei Arthrosepatienten ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern könnte.

Die in der Synovialflüssigkeit vorhandenen Faktoren, die eine Chondrocyten-Spät differenzierung bei den kranialen Chondrocyten in dieser vorliegenden Arbeit auslösten, waren mit den in dieser Arbeit benutzten Protease-Inhibitoren nicht zu hemmen. Auch der Zusatz von Matrixmetalloproteaseinhibitoren MMP-3-Inhibitor II und EDTA führte nicht zum Ausbleiben der Chondrocyten-Spät differenzierung bei den kranialen Chondrocyten. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe überein, die zeigen, daß nur IGF-I stimulierte, nicht aber thyroxinstimulierte Differenzierung durch Zusatz von Protease-Inhibitoren beeinflusst werden kann. Zusätzlich sollte in Erwägung gezogen werden, die Auswirkung von Matrixmetalloprotease-Inhibitoren in der dritten und letzten Stufe der enchondralen Ossifikation (Roach et al., 1995; Provot und Schipani, 2005) zu analysieren, in der es zur vaskulären Einsproßung und zu trabekulären Umbauten kommt.

Der T4-ELISA Test mit den Synovialflüssigkeiten von late-stage Arthrosepatienten zeigt eine deutliche Erhöhung der T4-Konzentration im Vergleich zur Synovialflüssigkeit von Traumapatienten (Kapitel 3.3.3). Um die thyroxinabhängige Differenzierung von Knorpelzellen durch Synovialflüssigkeiten im Detail zu verstehen,

wäre eine Möglichkeit, Versuchansätze mit Synovialflüssigkeit und einem Thyreostatikum anzusetzen, um herauszufinden, ob die erhöhte T4-Konzentration eine hinreichende Erklärung für die Chondrocyten-Spätendifferenzierung bei kranialen Chondrocyten ist und diese einen Ansatz in der Arthrosetherapie sein könnten.



## Literaturangaben

### Artikel und Bücher

- Ahlbäck S. Osteoarthritis of the knee: a radiographic investigation. *Acta Radiol Stockholm* 1968;(suppl 277):7-72.
- Andrew, J.G., J. Hoyland, A.J. Freemont and D. Marsh. 1993. Insulinlike growth gene expression in human fracture callus. *Calcif. Tissue Int.* **53**: 97-102
- Babarina, A.V., U. Moellers, K. Bittner, P. Vischer und P. Bruckner. 2001. Role of the subchondral vascular system in enchondral ossification: endothelial cell-derived proteinases depress late cartilage differentiation in vitro. *Matrix Biol.* **20**: 205-213
- Benya, P.D., J.D. Shaffer. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**: 215-224
- Bessey, A.O., O.H. Lowry, M.J. Brock. 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**: 321-329
- Bittner, K. 1997. Untersuchungen zur parakrinen Interaktionen zwischen Endothelzellen und Chondrocyten bei der Chondrocytenspätendifferenzierung *in vitro*. Dissertation Universität Witten/Herdecke
- Bittner, K., P. Vischer, P. Bartholmes, P. Bruckner. 1998. Role of subchondral vascular system in enchondral ossification: endothelial cells specifically depress late differentiation in resting chondrocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* **238**: 491-497
- Böhme, K., M. Conscience-Egli, T. Tschan, K.H. Winterhalter und P. Bruckner. 1992. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J. Cell Biol.* **116**: 1035-1042
- Böhme, K., K.H. Winterhalter und P. Bruckner. 1995. Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor- $\beta$ 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp. Cell. Res.* **216**: 191-198
- Cancedda, R., Descalzi-Cancedda, F. and Castagnola, P. 1995. Chondrocyte Differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **159**: 265-358
- Coughlin, S.R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 11023-11027
- D'Angelo, M., M. Pacifici. 1997. Articular chondrocytes produce factors that inhibit maturation of sternal chondrocytes in serum-free agarose cultures: a TGF-beta independent process. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1368-1377
- Descalzi-Cancedda, F., C. Gentili, P. Manduca, R. Cancedda. 1992. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell. Biol.* **117**: 427-435

Dieppe und Lohmander, Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis; *Lancet* 2005; **365**: 965-973

Drissi, H., M. Zuscik, R. Rosier und R. O'keefe. 2005. Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: Potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol.Aspects Med.* **26**:169-179

Gartner and Hiatt, Color Textbook of Histology

Gibson, G.J., W.J. Flint 1985. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to enchondral development. *J.Cell Biol.* **101**: 277-284

Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, K. Ijiri. 2006. The Control of Chondrogenesis. *J. Cell Biol.* **97**: 33-44

Hayden, J.M., S. Mohan, D.J. Baylink. 1995. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone.* **17**: 93-98

Heinegard, D., A. Oldberg. 1993. Glycosylated Matrix Protins. Connective Tissue and Its Heritable Disorders, Wiley-Liss, 189-209

Horton, W.A. 1993. Morphology of Connective Tissues: Cartilage. Connective Tissue and Its Heritable Disorders, Wiley-Liss, 73-84

Kellgren JH, Jeffrey M, Ball J. *Atlas of standard radiographs.* Oxford: Blackwell Scientific, 1963;2.

Kirsch, T., B. Swoboda und H. Nah. 2000. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis. Cartilage.* **8**: 294-302

Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. 1966.Osteo-arthrosis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis.* **25**:1-24

Li, Y., D.A. Lacerda, M.L. Warman, D.R. Beier, H. Yoshioka, Y. Ninomiya, J.T. oxford, N.P. Morris, K. Andrikopoulos, F. Ramirez. 1995. A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell* **80**: 423-430.

Liu, J.P., J. Baker, A.S. Perkins, E.J. Robertson, A. Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**: 59-72.

Mankin, H.J., H. Dorfman, L. Lippiello, A. Zarins. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* **53** (3): 523-537.

- Nilsson, O., R. Marino, F. De Luca, M. Phillip, J. Baron. 2005. Endocrine Regulation of the Growth Plate. *Horm Res.* **64**: 157-165
- Olson, B.R. 1996. Role of cartilage collagens in formation of the skeleton. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **785**: 124-130.
- Petersson et al. 1997. Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlbäck and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35-54 years with chronic knee pain. *Ann Rheum Dis.* **56**: 493-496 (August)
- Piek, E., C.H. Heldin, P. Ten Dijke. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* **13**: 2105-2124
- Poole, A.R., I. Pidoux. 1989. Immunoelectronmicroscopic studies of type X collagen in enchondral ossification. *J. Cell Biol.* **109**: 2547-2554
- Provot, S. und E. Schipani. 2005. Molecular mechanisms of enchondral bone development. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **328**: 658-665
- Pullig, O., G. Weseloh, D. Ronneberger, S. Kakonen und B. Swoboda. 2000. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif. Tissue Int.* **67**: 230-240
- Reginato, A.M., J.W. Lash, S.A. Jimenez 1986. Biosynthetic expression of type X collagen in embryonic chick sternum cartilage during development. *J.Biol.Chem.* **261**: 2897-2904
- Roach, H.I., J. Erenpreisa, T. Aigner. 1995. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell. Biol.* **131**: 483-494
- Rose-John, S., P.C. Heinrich. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300 (Pt 2)**: 281-290
- Savontaus, M., T. Ihanamaki, M. Perala, M. Metsaranta, M. Sandberg-Lall, E. Vuorio. 1998. Expression of type II and IX collagen isoforms during normal and pathological cartilage and eye development. *Histochem.Cell Biol.* **110**: 149-159.
- Stevens, A. und Lowe, J.S., Human Histology, Elsevier Health Sciences (United Kingdom), 2004
- Schiebler, Theodor H, Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie, Springer 1996
- Schimmel, M., R.D. Utiger. 1977. Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones. Review of recent findings and their clinical implications. *Ann.Intern.Med.* **87**: 760-768.

- Schmid, T.M., and M.E. Conrad. 1982. A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes. *J. Cell. Chem.* **257**: 12444-12450
- Schmid, T.M., and T.F. Linsenmayer. 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J. Cell. Biol.* **100**: 598-605
- Schmid, T.M., T.F. Linsenmayer. 1987. Type X Collagen. In: Mayne, R, R.E. Burgeson, eds. *Structure and function of collagen types*, Academic Press, Orlando, Florida, 223-259
- Schmid, T.M., A.A. Cole, Q. Chen, D.K. Bonen, L. Luchene, T.F. Linsenmayer. 1994. Assembly of Type X Collagen by Hypertrophic Chondrocytes. In: Yurchenko, P D, D.E. Birk, R.P. Mecham, eds. *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, Academic Press, San Diego, 171-206
- Sokoloff, L. 1979. Pathology and pathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis and Allied Conditions*. D.J. McCarthy, editor. Lea and Ferbiger, Philadelphia, PA. 1135-1153
- Solursh, M., K.L. Jensen, R.S. Reiter,, T.M. Schmid, and T.F. Linsenmayer. 1986. Environmental regulation of typ X production by cultures of limb mesenchyme, mesectoderm, and sternal chondrocytes. *Dev. Biol.* **117**: 90-101
- Stickens, D., D.J. Behonick, N. Ortega, B. Heyer, B. Hartenstein, Y. Yu, A.J. Fosang, M. Schorpp-Kistner, P. Angel und Z. Werb. 2004. Altered enchondral bone development in matrix metallproteinase 13-deficient mice. *Development.* **131**: 5883-5895
- Swiderski, R.E., M. Solursh. 1992. Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev.Dyn.* **194**: 118-127.
- Treuta, J. und Little, K. 1960. The vascular contribution to osteogenesis. II. Studies with the electron microscope. *J. Bone joint Surg.Br.* **42-B**: 367-76.:367-76
- Van der Eerden, B.C.J., M. Karperien, J.M. Wit. 2003. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. *Endocrine Reviews.* **24(6)**: 782-801
- Treuta, J. und Morgan, J.D. 1960. The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method. *J. Bone joint Surg.Br.* **42-B**: 97-109.:97-109
- Vischer, P., E. Buddecke. 1985. Alteration of glucosyltransferase activities during proliferation of cultivated arterial endothelial cells and smooth muscle cells. *Exp. Cell. Res.* **158**: 15-28
- Von der Mark et al. 1992. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of hondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheumatism.* **35**: 806-811

Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G.V. Segre, H.M. Kronenberg, C.J. Tabin. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein [see comments]. *Science* **273**: 613-622

Vortkamp, A.. 2001. Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in developing embryo. *Osteoarthritis. Cartilage*. **9 Suppl A**: S109-17.

Vu, T.H., J.M. Shipley, G. Bergers, J.E. Berger, J.A. Helms, D. Hanahan, S.D. Shapiro, R.M. Senior und Z. Werb. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. **93**: 411-422

Wang, J., J. Zhou, C.A. Bondy. 1999. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J*. **13**: 1985-1990.

Woods, K.A., C. Camacho-Hubner, M.O. Savage, A.J. Clark. 1996. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N.Engl.J.Med*. **335**: 1363-1367.

## Internetquellen für Abbildungen und Tabellen

Abb. 1 - 3 : [www.ruhr.de/.../histologie/](http://www.ruhr.de/.../histologie/)

Abb. 6 : [www.kgu.de](http://www.kgu.de)

Abb. 7 : [www.arthrose-zentrum.de](http://www.arthrose-zentrum.de)

Abb. 8 : [www.onmeda.de](http://www.onmeda.de)

Abb. 9 : [www.vincentius-krankenhaus.de](http://www.vincentius-krankenhaus.de)

Tab. 3 + 4 : O.P.I.S. Dr. Gumpert & Dr. Jungermann

## Abkürzungen

ALP	alkaline phosphatase
DMEM	Dulbucces modified Eagle Medium
ECCM	endothelcell-conditioned-medium
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	fibroblast growth factor
IGF	insulin-like growth factor
Ihh	Indian hedgehog
MMP	matrix-metallo-protease
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PTHrP	parathyroid hormon-related peptide
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T3	Thrijodothyronin
T4	Thyroxin
TGF	transforming growth factor

## *Danksagung*

Ein herzliches Dankeschön an :

- **Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner**, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen
- **Dr. Rita Dreier**, die mir bei der Planung und Durchführung der Arbeit, sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift in allen fachlichen Fragen stets kompetent zur Seite stand
- **Marianne Ahlert** für ihre unendliche Geduld und die vielen konstruktiven Gespräche
- **Dr. Thomas Pap** für die Bereitstellung von Synovialflüssigkeiten verschiedener Patienten zur Durchführung meiner wissenschaftlichen Untersuchungen
- der gesamten **Arbeitsgruppe von Professor Bruckner** für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre
- alle **Technischen Assistentinnen** aus dem **Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie** der **Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster** für deren Unterstützung
- meine engen Freunde **Heike und Thorsten Most**, die mir oft Kost und Logis zur Verfügung gestellt haben, wenn mich die Bahn im Stich gelassen hat
- meine **Eltern**, die mir das Studium erst ermöglichten und die auch jetzt während der Promotionsarbeit immer für mich da waren
- meinen **Ehemann Peter**, der meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte, mich stets motiviert und angespornt hat
- meine **Schwester Sabrina** und meine **Freundin Heike Ferchow**, die mich bei der Durchsicht, Formatierung und Korrektur der Arbeit unterstützt haben .



# VERENA NIELÄNDER

## ANSCHRIFT

---

Gräwenkolkstr. 102  
45770 Marl  
Telefon: 02365/ 503708

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum: 18. April 1978  
Geburtsort: Marl  
Familienstand: verheiratet  
Geburtsname: Hered

## SCHULBILDUNG

---

1984 bis 1988	Max-Reger Grundschule, Marl
1988 bis 1994	Ernst-Immel Realschule, Marl Abschluß: Fachoberschulreife
1994 bis 1997	Geschwister-Scholl Gymnasium, Marl Abschluß: Abitur

## STUDIUM

---

Seit Wintersemester 1997/98

März 2001	Physikum
März 2002	1. Staatsexamen
März 2004	2. Staatsexamen
Mai 2005	3. Staatsexamen

## BERUFLICHER WERDEGANG

---

Oktober 2006 bis dato	Anstellung im Knappschaftskrankenhaus in Recklinghausen als Assistenzärztin in der Radiologischen Klinik Ärztin in der Weiterbildung
--------------------------	---

## PROMOTION

---

Juni 2005 bis voraussichtlich 2008	Westfälische Wilhelms-Universität, Münster Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie Prof. Dr. Peter Bruckner
--	---