

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die  
Genexpression humaner artikulärer Chondrozyten  
während Expansion und Redifferenzierung  
in einem *in vitro*-Modell**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Timo Michael Heintel**  
aus Würzburg

Würzburg, April 2006

Referent: Prof. Dr. med. Arnulf Weckbach  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze  
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2006

Der Promovend ist Arzt

## **Meinen Eltern**

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Historischer Rückblick .....	1
1.2 Thematik .....	1
1.3 Autologe Chondrozyten-Transplantation .....	3
1.4 Knorpelgewebe .....	4
1.4.1 Der strukturelle Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels .....	5
1.4.2 Knorpelgrundsubstanz .....	7
1.4.2.1 Kollagene .....	8
1.4.2.2 Proteoglycane .....	9
1.5 Knorpelmetabolismus .....	10
1.6 Knorpelzellkultur - Entdifferenzierung .....	10
1.6.1 Morphologische Veränderungen während der Entdifferenzierung .....	11
1.6.2 Funktionelle Veränderungen während der Entdifferenzierung .....	12
1.7 Stickstoffmonoxid .....	13
1.7.1 Eigenschaften von NO .....	13
1.7.2 NO-Synthasen .....	14
1.7.2.1 Isoformen .....	14
1.7.2.2 Struktur .....	15
1.7.2.3 Reaktionsablauf .....	16
1.7.2.4 Regulation .....	17
1.7.3 Funktionen von NO .....	18
1.7.4 Funktion und Wirkung von NO im hyalinen Gelenkknorpel .....	19
1.7.5 Bisherige Erkenntnisse zur Genexpression der NOS-Isoformen im humanen Gelenkknorpel .....	20
<b>2 Fragestellung</b> .....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	24
3.1 Knorpelzellkultur .....	24
3.1.1 Herkunft des Knorpelgewebes .....	24
3.1.2 Enzymatische Isolierung humaner artikulärer Chondrozyten .....	24
3.1.3 Zellzählung – „dye-exclusion-test“ .....	26

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.4 Kultivierung humaner artikulärer Chondrozyten .....	27
3.1.4.1 Monolayer-Kultur .....	27
3.1.4.2 Pellet-Kultur .....	28
3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
3.2 cDNA-Zellklone .....	29
3.2.1 Kultivierung und Selektion transfizierter Bakterienzellen .....	30
3.2.2 Glycerinkultur .....	30
3.3 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien .....	31
3.3.1 Miniprep-System .....	31
3.3.2 Midiprep-System .....	31
3.3.3 Quantifizierung und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA .....	31
3.4 RNA-Isolation .....	32
3.4.1 RNA Isolation - Monolayer-Kultur .....	32
3.4.2 RNA Isolation - Pellet-Kultur .....	33
3.4.3 Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA .....	33
3.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	34
3.5.1 Restriktionsenzyme .....	34
3.5.2 Restriktionsansatz .....	34
3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	35
3.6.1 Reverse Transkription .....	35
3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	36
3.6.2.1 Prinzip der PCR .....	37
3.6.2.2 PCR-Protokolle .....	37
3.6.2.3 Oligonucleotide .....	39
3.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	41
3.7.1 Densitometrische Auswertung der DNA-Banden .....	42
3.7.2 Statistische Auswertung .....	42
3.8 Sequenzierung von DNA .....	42
3.8.1 Sequenzierungsreaktion .....	43
3.8.2 Aufreinigung der PCR-sequenzierten Proben .....	44

3.8.3 Computergestützte Sequenzanalyse .....	44
3.9 Quantifizierung der NO-Produktion .....	45
3.9.1 Griess-Reaktion .....	45
3.9.2 Statistische Auswertung .....	45
3.10 Histochemie und Immunhistochemie .....	46
3.10.1 Aufarbeitung der Zellpellets für Kryostatschnitte .....	46
3.10.2 Schnitte am Kryostaten.....	46
3.10.3 Histochemie - Alzian-Blau-Färbung .....	46
3.10.3.1 Protokoll der Alzian-Blau-Färbung .....	47
3.10.3.2 Auswertung der Alzian-Blau-Färbung .....	47
3.10.4 Immunhistochemie für Kollagen Typ II.....	47
3.10.4.1 Antikörper.....	48
3.10.4.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung.....	49
3.10.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung .....	50
3.11 Medien für die Zellkultur .....	50
3.12 Puffer und Lösungen .....	52
3.13 Material.....	53
3.13.1 Verwendete Geräte .....	53
3.13.2 Enzyme .....	55
3.13.3 Kit-Systeme .....	55
3.13.4 Verwendete Produkte .....	55
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
4.1 Patientenmaterial und verwendete Assays .....	58
4.2 Zellmorphologie und Wachstumsverhalten.....	59
4.2.1 Monolayerkultur .....	59
4.2.2 Pelletkultur .....	60
4.3 Kontrolle der Differenzierungsbedingungen durch Markeranalyse .....	62
4.3.1 Kollagen Typ I.....	62
4.3.2 Kollagen Typ II .....	63
4.3.2.1 Immunhistochemie .....	63

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.2.2 PCR.....	65
4.3.3 Aggrecan.....	65
4.3.4 Darstellung der sulfatierten Glykosaminoglykane mittels Alzian-Blau.....	66
4.4 Etablierung der PCR-Bedingungen für nNOS, iNOS und eNOS.....	69
4.4.1 Sequenzierung von DNA.....	69
4.4.1.1 Sequenzanalyse des Inserts von Klon <i>IMAGp998L13612</i> .....	70
4.4.1.2 Sequenzanalyse des Inserts von Klon <i>IMAGp998E09512</i> .....	70
4.4.1.3 Sequenzanalyse des Inserts von Klon <i>IMAGp998I126077</i> .....	71
4.4.1.4 Kontroll-Sequenzierung von PCR-Amplifikaten .....	71
4.5 Spezifische RT-PCR.....	71
4.5.1 Qualitätskontrolle mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase.....	71
4.5.2 Negativkontrollen .....	72
4.5.3 Genexpression der NOS-Isoformen.....	72
4.5.3.1 nNOS .....	73
4.5.3.2 iNOS .....	73
4.5.3.3 eNOS .....	74
4.5.3.4 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression der NOS-Isoformen .....	77
4.5.3.5 Einfluss von TNF $\alpha$ auf die Expression der NOS-Isoformen.....	79
4.5.3.6 Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die Expression der NOS-Isoformen.....	81
4.5.4 Auswirkungen der Inhibition der NOS auf die Genexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II während der Redifferenzierung.....	83
4.5.5 Genexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II unter Einfluss des NO-Donors DETA-NONOate.....	84
4.5.6 Einfluss der potentiell NOS-modulierenden Cytokine IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan .....	85
4.6 NO-Freisetzung in Chondrozytenpellets .....	89
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>93</b>
5.1 Diskussion der angewandten Methoden.....	93
5.1.1 Zellkulturen .....	93
5.1.1.1 Validität der angewandten Zellkulturen .....	93

5.1.1.2 Reliabilität der angewandten Zellkulturen .....	94
5.1.2 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen .....	95
5.1.2.1 Alzian-Blau-Färbung.....	95
5.1.2.2 Immunhistochemie – Kollagen Typ II.....	96
5.1.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	96
5.1.4 Indirekte Messung des freigesetzten NO mit dem Griess-Assay .....	97
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	98
5.2.1 Charakterisierung des zellulären Phänotyps im zeitlichen Verlauf der Kultivierung.....	98
5.2.1.1 Zellmorphologie und Wachstumsverhalten.....	98
5.2.1.2 Histochemische und immunhistochemische Charakterisierung des zellulären Phänotyps.....	99
5.2.1.2.1 Histochemie – Alzian-Blau-Färbung.....	99
5.2.1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ II.....	100
5.2.1.3 RT-PCR-Untersuchungen zur Charakterisierung des zellulären Phänotyps .....	101
5.2.1.3.1 Aggrecan.....	101
5.2.1.3.2 Kollagen Typ I und II .....	101
5.2.1.4 Schlussfolgerung .....	102
5.2.2 Genexpression der NOS-Isoformen während Expansion und Redifferenzierung humaner artikulärer Chondrozyten.....	103
5.2.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener, potentiell NOS- modulierender Cytokine auf humane artikuläre Chondrozyten .....	104
5.2.3.1 Einfluss von TGF $\beta$ auf die Genexpression der NOS-Isoformen..	104
5.2.3.2 Einfluss von Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) und Tumor-Nekrose- faktor-alpha (TNF $\alpha$ ) auf humane artikuläre Chondrozyten.....	105
5.2.4 Physiologische Bedeutung von NO für humane artikuläre Chondrozyten .....	107
5.2.4.1 Einfluss des NO-Donor DETA-NONOate auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan.....	107

5.2.4.2 Einfluss des NOS-Inhibitors N <sup>G</sup> -Amino-L-Arginin (L-NAA) auf die Redifferenzierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten .....	108
5.3 Fazit .....	111
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	



## **1 Einleitung**

### **1.1 Historischer Rückblick**

An den Grundlagen für den biologischen Knorpelersatz wurden bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts geforscht. 1922 versuchte A. Fischer erstmalig eine „Reinkultur“ für Knorpelzellen anzulegen. Bei seinen Untersuchungen konnte er eine „Transformation der Zellen“ beobachten, ein Phänomen das heute als Ent- oder Dedifferenzierung bezeichnet wird [60] (vgl. Kap. 1.6). 1952 gelang es A. Moscona erstmals durch Andau mit Trypsin vitale Knorpelzellen aus embryonalem Gewebe zu isolieren [205]. Aufgrund des hohen Kollagenfaseranteils in der Extrazellulärmatrix des adulten Knorpels war diese Methode jedoch auf die Anwendung an embryonalem Gewebe beschränkt. Der zusätzlichen Einsatz einer Clostridien-Kollagenase ermöglichte es Arbeitsgruppen um Smith und Kawiak 13 Jahre später lebensfähige Knorpelzellen auch aus adultem Knorpelgewebe herauszulösen [107, 204, 205]. 1967 etablierten dann Manning und Bonner die erste echte „Reinkultur“ humaner artikulärer Chondrozyten [130].

Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelte eine schwedische Arbeitsgruppe am Kaninchenmodell eine Methode zur Behandlung von Knorpeldefekten mit *in vitro* amplifizierten autologen Chondrozyten [73]. Dieses, als Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) bezeichnete Verfahren wurde in seiner klinischen Anwendung am Menschen erstmals 1994 von Brittberg beschrieben [28]. Sowohl experimentell, als auch in den ersten klinischen Anwendungen erzielte diese Technik bisher vielversprechende Ergebnisse [29, 73, 119, 171-173, 229]. Zudem wirkte sie als Katalysator für den wissenschaftlichen Fortschritt vieler Arbeiten auf diesem Sektor.

### **1.2 Thematik**

Läsionen des hyalinen Gelenkknorpels stellen Erkrankungen von immenser medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung dar. Alleine in der Bundesrepublik Deutschland werden durch Gelenkerkrankungen pro Jahr über 50 Millionen Arbeitsausfallstage und 5 Millionen Krankenhaustage bedingt, die wiederum mehr als 40% aller stationär durchgeführten Rehabilitationsmaßnahmen nach sich ziehen [90]. Die steigende Zahl an Verletzungen jüngerer Menschen, bedingt durch ein verändertes

Freizeitverhalten sowie die demographische Entwicklung der kommenden Jahre werden vermutlich noch zu einer weiteren Verschärfung dieser Situation führen.

Knorpelschäden können durch eine Vielzahl von Mechanismen hervorgerufen werden. Zu nennen sind hier insbesondere primäre sowie sekundäre degenerative Veränderungen bei anlagebedingten oder posttraumatischen Achsfehlstellungen und Instabilitäten, postarthritische Veränderungen nach bakteriellen, reaktiven oder autoimmunbedingten Gelenkentzündungen sowie verschiedene metabolische und endokrine Erkrankungen. Davon abzugrenzen sind isolierte Knorpelläsionen ohne Vorliegen einer Arthrose. Sie werden in erster Linie durch direkte traumatische Gelenkschädigungen mit Beteiligung des Knorpels, z. B. im Rahmen von osteochondralen Frakturen und durch aseptische Nekrosen von Gelenkanteilen, wie beispielhaft bei der Osteochondrosis dissecans, verursacht.

Gelenkknorpel besitzt weder Blut- noch Lymphgefäße und ist nicht innerviert. Die eingeschränkte Migrationsfähigkeit der Chondrozyten sowie die fehlende Einblutung in entstandene Defekte und, damit verbunden, das Ausbleiben einer Invasion von gewebsspezifischen Stammzellen limitieren die intrinsische Regenerationsfähigkeit dieses bradytrophen Gewebes [31]. Nicht zuletzt aufgrund dieser Gegebenheiten ist die Therapie chondraler und osteochondraler Gelenkflächendefekte seit Jahrzehnten Gegenstand aufwendiger experimenteller Untersuchungen und klinischer Beobachtungen.

Die Behandlung von degenerativ oder traumatisch geschädigten Gelenkflächen stellt in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie eine große Herausforderung dar. Die derzeitige chirurgische Therapie höhergradiger Knorpelschäden beim jüngeren Patienten umfasst zahlreiche verschiedene Verfahren. Zum Einsatz kommen u.a. die arthroskopische Gelenklavage, das arthroskopische Gelenkdebridement (arthroskopische Knorpelglättung) [20, 206], die Anbohrung des subchondralen Knochens nach Pridie (Pridie-Bohrung) [178], die Spongiosierung nach Ficat [59], die Abrasionsarthroplastik nach Johnson [104, 105], die Mikrofrakturierung nach Rodrigo

[183, 210] und die autologe Chondrozyten-Transplantation [28]. Keines dieser Verfahren kann jedoch eine vollständige Regeneration von geschädigtem Knorpelgewebe erreichen. Die Wirksamkeit der häufig durchgeführten arthroskopischen Lavage und des Debridements von Knorpelfragmenten liegt hauptsächlich in der Entfernung von Zelldetritus und Entzündungsmediatoren, die eine Synovitis verursachen und außerdem zur weiteren Degradation des Knorpel führen würden [113, 146]. Hierdurch lässt sich verständlicherweise nur eine temporäre Verbesserung der Symptomatik erreichen [177]. Das Prinzip der anderen aufgeführten Methoden besteht im Wesentlichen darin, eine Einwanderung mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen zu erwirken. Auf diese Art und Weise wird jedoch lediglich eine fibrokartilaginäre Vernarbung im Bereich des Defektes induziert [32, 33, 93]. Die strukturelle Ausbildung und langfristige biomechanische Belastbarkeit dieses Narbengewebes sind dabei nicht vorhersehbar. Verschiedene Ansätze zur autogenen Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern [228] bleiben Spezialindikationen vorbehalten. Neben der limitierten Verfügbarkeit der Transplantate sind sie mit zahlreichen weiteren Problemen behaftet und werden in der Literatur kontrovers diskutiert [47, 164].

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse dieser konventionellen operativen Verfahren sowie der Fortschritte in der Gewebe- und Zellkultivierung erlangen neue biotechnologische Methoden zunehmende Bedeutung in der Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz dieser neuen Therapieansätze ist allerdings eine detaillierte Kenntnis des Chondrozytenstoffwechsels, sowie der damit verbundenen zellphysiologischen Prozesse. Hier bestehen jedoch in vielen Bereichen, trotz intensiver Forschung, noch große Wissenslücken.

### **1.3 Autologe Chondrozyten-Transplantation**

Im Rahmen einer Arthroskopie wird hierbei die Diagnose endgültig gesichert und die Indikation zur ACT gestellt. Aus einem wenig belasteten Bereich des Kniegelenks, in der Regel der medialen oder lateralen Trochleakante, werden 200 bis 300mg intaktes Knorpelgewebe entnommen. Das gewonnene Knorpelbiopsat wird in ein steriles

Transportgefäß mit spezieller Nährlösung gegeben und der weiteren Aufbereitung zugeführt. In einem spezialisierten Zellkulturlabor werden die Chondrozyten enzymatisch aus der, sie umgebenden Matrix herausgelöst und in Monolayerkultur vermehrt. Nach etwa 4 Wochen sind ausreichend hohe Zellzahlen erreicht. Zur Implantation wird das Gelenk über einen geeigneten Zugang eröffnet, der Defekt dargestellt und unter Schonung der subchondralen Platte sorgfältig debridiert. Ein vom medialen Tibiakopf, der Tibiavorderkante oder dem ventralen Femuraspekt entnommener Periostlappen passender Größe wird mit resorbierbarem Nahtmaterial auf den Defekt aufgenäht. Das Cambium-Layer zeigt hierbei zur subchondralen Platte. Nach Einfüllen der Chondrozyten-Suspension wird dieser, gerne auch als „bioaktive Kammer“ [27] bezeichnete Raum mit Fibrinkleber versiegelt. Im Idealfall setzen sich die Zellen binnen 24 bis 48 Stunden auf dem Defektgrund ab, redifferenzieren in funktionelle Knorpelzellen und beginnen mit der Synthese neuer Knorpelmatrix [28, 53, 73], die zu einer Auffüllung des Defektes mit hyalinartigem Knorpel („hyaline like cartilage“) führt.

In der Zwischenzeit hat dieses Konzept zahlreiche Modifikationen erfahren. Diese betreffen insbesondere die Art der Expansion der Zellen sowie den Periostlappen. Neben der reinen Zellsuspension kommen zunehmend Trägersubstanzen wie Agarose, Alginat, Kollagen oder verschiedene synthetische biodegradable Polymere zum Einsatz [131, 189] (matrixassoziierte ACT), welche den Transfer und Verleib der Zellen in der Defektzone gewährleisten sollen und somit die Funktion des Periostlappens ersetzen. Nach wie vor erfordern diese Verfahren jedoch eine Entnahme von intaktem Knorpelgewebe. In wie weit diese Knorpelbiopsie durch Verwendung mittels Knochenmarkspunktion gewonnener MSC ersetzt werden kann wird gegenwärtig erforscht.

### **1.4 Knorpelgewebe**

Knorpelgewebe zählt zu den Stützgeweben des Körpers. Entwicklungsgeschichtlich leitet es sich vom typischen embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym ab, das frühembryonal aus dem mittleren Keimblatt, dem sog. Mesoderm hervorgeht [144].

Embryonal wird der größte Teil des Skeletts aus hyalinem Knorpel angelegt (Primordialskelett) [218]. Während der Entwicklung schließen sich die Mesenchymzellen zu einer mehr oder weniger kompakten Zellmasse zusammen. Über das Stadium der Vorknorpelzellen differenzieren die Mesenchymzellen zu Chondroblasten und diese wiederum zu Chondrozyten. Bereits während dieser Differenzierung beginnen die Zellen mit der Synthese einer spezifischen Interzellulärsubstanz, der Matrix (Knorpelgrundsubstanz) [218, 219].

Je nach Art und Zusammensetzung dieser Interzellulärsubstanz lassen sich drei Knorpelarten unterscheiden: hyaliner Knorpel, Faserknorpel und elastischer Knorpel.

#### **1.4.1 Der strukturelle Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels**

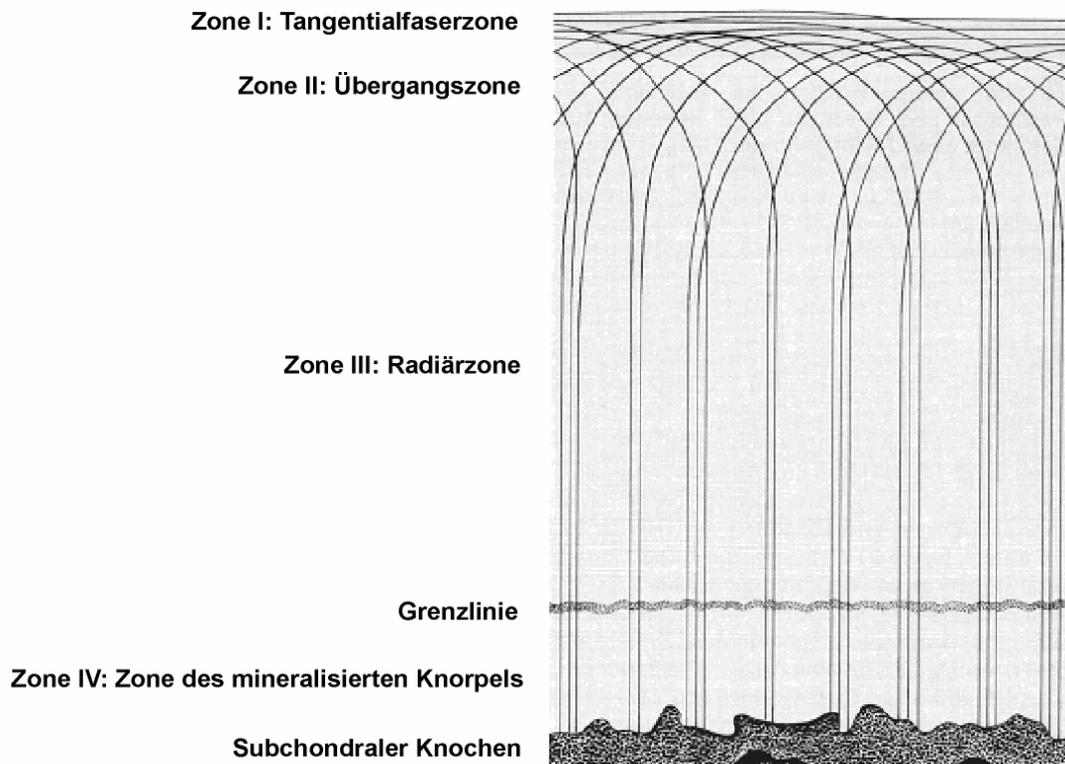
Nach Abschluss des Wachstums kommt Hyalinknorpel nur noch an den echten Gelenken, den Diarthrosen, im sternalen Anteil der Rippen, im Skelett der Nase sowie der mittleren und tiefen Luftwege vor [218]. In den Gelenken überzieht er als dünne Schicht von 1 bis 8mm die Gelenkflächen und stellt hier das entscheidende, biomechanisch beanspruchte Funktionsgewebe dar. Zusammen mit der Synovia ermöglicht er ein nahezu reibungsfreies Gleiten und eine gleichmäßige Druckverteilung auf die Gelenkkörper. Des weiteren dient er als viskoelastischer Puffer zwischen den miteinander artikulierenden Skelettelementen.

Histologisch zeigt hyaliner Gelenkknorpel einen typischen laminären oder zonalen Aufbau. Nach dem von Benninghoff aufgestellten Arkadenschema unterscheidet man 4 verschiedene Zonen [15, 16] (vgl. Abb. 1.1). Innerhalb jeder Zone weisen die kollagenen Faserbündel wie auch die Chondrozyten charakteristische Anordnungen und Durchmesser auf:

Die Zone des mineralisierten Knorpels (Zone IV) liegt dem subchondralen Knochengewebe direkt auf und ist durch eine Grenzlinie, die sogenannte Tidemark, von der benachbarten Radiärzone abgegrenzt. Die Kollagenfibrillen dieser Schicht stehen mit ihrer Längsachse senkrecht zur Knorpelknochengrenze, überschreiten diese jedoch nicht. Die vielfach verzahnte Kontur dieser Grenzzone besitzt wichtige biomechanische Funktion bei der Kraftübertragung auf den subchondralen Knochen. Die Chondrozyten dieser relativ zellarmen Zone werden von einem Saum nicht mineralisierter

Extrazellulärmatrix umgeben. Die sich anschließende Radiärzone (Zone III), die breiteste Schicht des Gelenkknorpels, zeigt ebenfalls eine überwiegend senkrechte Ausrichtung der Faserbündel. Es dominieren große rundliche Knorpelzellen mit relativ langen Zytoplasmfortsätzen. Sie liegen in isogenen Gruppen und sind bei Gelenken mit dickem Knorpelbelag in Säulen angeordnet, die senkrecht zur Oberfläche stehen. In der Übergangszone (Zone II) biegen die Fibrillen dann bogenförmig um und bilden untereinander die für diese Zone charakteristischen Überkreuzungen. Eine Vorzugsrichtung ist in diesem Bereich nicht zu erkennen. Die großen ovalen Knorpelzellen liegen einzeln oder in isogenen Gruppen. In der oberflächlichen Schicht (Zone I) verlaufen die Kollagenfibrillen eine kurze Strecke tangential zur Gelenkfläche. Daher wird diese Schicht auch als Tangentialfaserzone bezeichnet. Die Verlaufsform der Kollagenfibrillen sorgt für eine optimale Aufnahme und Verteilung der dort auftretenden Scher- und Druckkräfte. Die Chondrozyten dieser Schicht sind länglich, platt und mit ihrer Längsachse ungefähr parallel zur Oberfläche orientiert. Die Zelldichte ist deutlich höher als in den tieferen Schichten. An der Peripherie der überknorpelten Gelenkfläche besteht ein kontinuierlicher Übergang zwischen Tangentialfaserzone und Membrana synovialis der Gelenkkapsel.

Die Ernährung des avaskulären Knorpelgewebes erfolgt durch Diffusion von Nährstoffen vorwiegend aus der Synovialflüssigkeit sowie zu geringeren Anteilen aus den Gefäßen des subchondralen Kochengewebes. Mit zunehmender Reife des Bewegungsapparates gewinnt die Ernährung über die Synovialflüssigkeit weiter an Bedeutung. Nach Abschluss des Wachstums werden lediglich bei Gelenken mit dickem hyalinen Knorpel die tiefen Schichten noch in nennenswertem Ausmaß über Gefäße des subchondralen Knochens versorgt.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Verlaufs der Kollagenfibrillen im Gelenkknorpel [219].

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein multiphasisches Gewebe. Er besteht aus einer einzigen Zellpopulation, den Chondrozyten, die in ein dreidimensionales Netzwerk hochorganisierter Matrixstrukturen integriert sind [132, 147, 148, 151]. Die Zellen treten dabei gegenüber der umgebenden Extrazellulärmatrix massenmäßig zurück. Im adulten Gelenkknorpel liegt ihr Volumenanteil bei lediglich 1 bis 4% [32, 106]. Den Rest des gesamten Gewebevolumentums (96 bis 99%) nimmt die Interzellulärsubstanz ein. Sie bildet die Grundlage für die einzigartigen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels. Im Gegensatz zu parenchymatösen Organen wie beispielsweise Leber oder Niere beruht die Funktion hier primär nicht auf den einzelnen Zellen sondern auf der von ihnen produzierten und aufrecht erhaltenen makromolekularen Matrix [37, 120, 149].

### 1.4.2 Knorpelgrundsubstanz

Die Knorpelgrundsubstanz (extrazelluläre Matrix, Interzellulärsubstanz) besteht aus 2 Komponenten: der Gewebsflüssigkeit und einem Netzwerk aus Makromolekülen, die dem Gewebe seine Form und Stabilität verleihen [32]. Die Gewebsflüssigkeit setzt sich aus Wasser und den darin gelösten Ionen zusammen. Sie macht etwa 70 bis 75% des Gesamtvolumens aus. Die restliche 25 bis 30% verteilen sich auf die verschiedenen strukturellen Makromoleküle des Knorpels: Kollagene (60%), Proteoglycane (25 bis 35%) sowie nicht-kollagene Proteine (15 bis 20%) [32, 106, 116, 129, 140, 141].

---

#### Proteine der extrazellulären Matrix

---

<b>Kollagene</b>	Typ II
	Typ IX
	Typ XI
	Typ VI
	Typ X (Epiphysenfuge)
	Typ XII
	Typ XIV
<b>Proteoglycane</b>	Aggrecan
	Biglycan
	Decorin
	Fibromodulin
	Lumican
<b>Nicht-kollagene Proteine</b>	Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
	Cartilage matrix protein (matrilin 1)
	Anchorin II
	Tenascin
	Thrombomodulin
	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein (PRELP)
	Chondroadherin
Fibronectin	
<b>Membranproteine</b>	Syndecan
	Adhäsionsmolekül CD44
	Integrine ( $\alpha$ 1, 2, 3, 5, 6, 10 ; $\beta$ 1, 3, 5)

---

**Tab. 1.1:** Proteine in der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes; nach Ref. [68].

### 1.4.2.1 Kollagene

Rund ein Viertel des Proteingehaltes des menschlichen Organismus besteht aus Kollagenen [51]. Sie bilden typischerweise unlösliche Fasern hoher Zugfestigkeit aus. Hauptaufgabe der fibrillenbildenden Kollagene (Kollagentypen I, II, III, V und XI) ist es, als Strukturelemente die Gewebearchitektur vorzugeben und die Gewebestabilität zu gewährleisten.

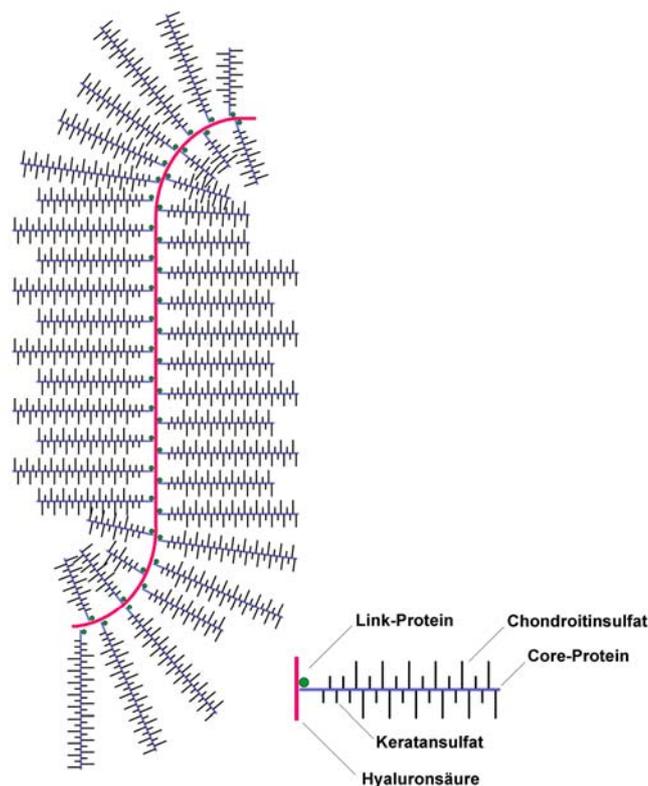
Der hyaline Gelenkknorpel enthält eine ganze Reihe unterschiedlicher Kollagen-Typen (vgl. Tab. 1.1) [56, 57, 193]. Kollagen Typ II, ein Homotrimer, das aus 3  $\alpha_1$ -Typ-II-Ketten besteht, macht in Form feiner Fibrillen 90 bis 95% des Kollagens im hyalinen Gelenkknorpel aus. Die einzelnen Kollagen Typ II-Moleküle sind kovalent durch Pyrimidine (crosslinks) netzartig verbunden.

Typ II-Kollagen ist durch das Vorkommen von viel Hydroxylysin gekennzeichnet, einer Aminosäure, die die Tropokollagenmoleküle der Fibrillen untereinander verknüpft und die Fähigkeit besitzt Disaccharide zu binden. Die anderen Kollagen-Typen kommen zu wesentlich geringeren Anteilen vor.

### 1.4.2.2 Proteoglycane

Proteoglycane sind nach den Kollagenen die zweithäufigste Komponente der Knorpelmatrix [32] und werden ebenfalls von den Chondrozyten produziert. Prinzipiell können im hyalinen Gelenkknorpel zwei große Klassen von Proteoglycanen unterschieden werden: zum einen hochmolekulare Proteoglycanmonomere, die sog. Aggrecane, die dazu neigen Aggregate zu bilden, zum anderen die kleinen Proteoglycane wie Decorin, Biglycan und Fibromodulin [36, 81, 176, 186-188, 194]. Proteoglycane bestehen aus einem gestreckten zentralen Protein (core protein, Molekulargewicht 250 bis 300kDa) von dem eine oder mehrere lange, unverzweigte Seitenketten aus Glykosaminoglykanen ausgehen (vgl. Abb. 1.2). Die Glykosaminoglykane der Proteoglycane setzen sich aus repetitiven Disaccharideinheiten zusammen. Jede dieser Disaccharideinheiten verfügt über mindestens eine negativ geladene Carboxyl- oder Sulfat-Gruppe [81, 186-188]. Aufgrund der hohen Zahl negativer Ladungen besitzen die Proteoglycane ein enormes Wasserbindungsvermögen und sorgen somit für die Druckelastizität des Knorpels [6].

Mit einem Anteil von fast 90% ist Aggrecan unter den Proteoglycanen des Gelenkknorpels das Wichtigste. Der Rest entfällt auf die langen (10%) und kurzen (3%) nicht-aggregierenden Proteoglycane. In sog. Proteoglycan-Aggregaten sind ungefähr 140 Aggrecan-Moleküle in Intervallen von 30nm nicht-kovalent an ein sehr langes Filament aus Hyaluronsäure gebunden. Diese Wechselwirkung wird von einem kleinen Verbindungsprotein, dem sog. *link protein* vermittelt. Der gesamte Komplex hat eine Masse von etwa  $2 \times 10^6$  Da und eine Länge von ungefähr  $2 \mu\text{m}$  [34-36]. Aggrecan-Moleküle füllen fast den gesamten Raum zwischen den einzelnen Fibrillen der Extrazellulärmatrix aus. Die einzelnen Schichten des Hyalinknorpels weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Matrix auf. Die höchste Proteoglycan-konzentration findet sich in der breiten Radiärzone [32, 176].



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung eines Proteoglycan-aggregats aus dem Knorpel; Modifiziert nach Ref. [185].

### **1.5 Knorpelmetabolismus**

Der Einfluss verschiedener Mediatoren auf den Knorpelmetabolismus wurde insbesondere im Rahmen von Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der Arthrose in den vergangenen Jahren intensiv beforscht. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Zytokine mit Einfluss auf den Knorpelmetabolismus findet sich in Tab. 1.2.

### **1.6 Knorpelzellkultur - Entdifferenzierung**

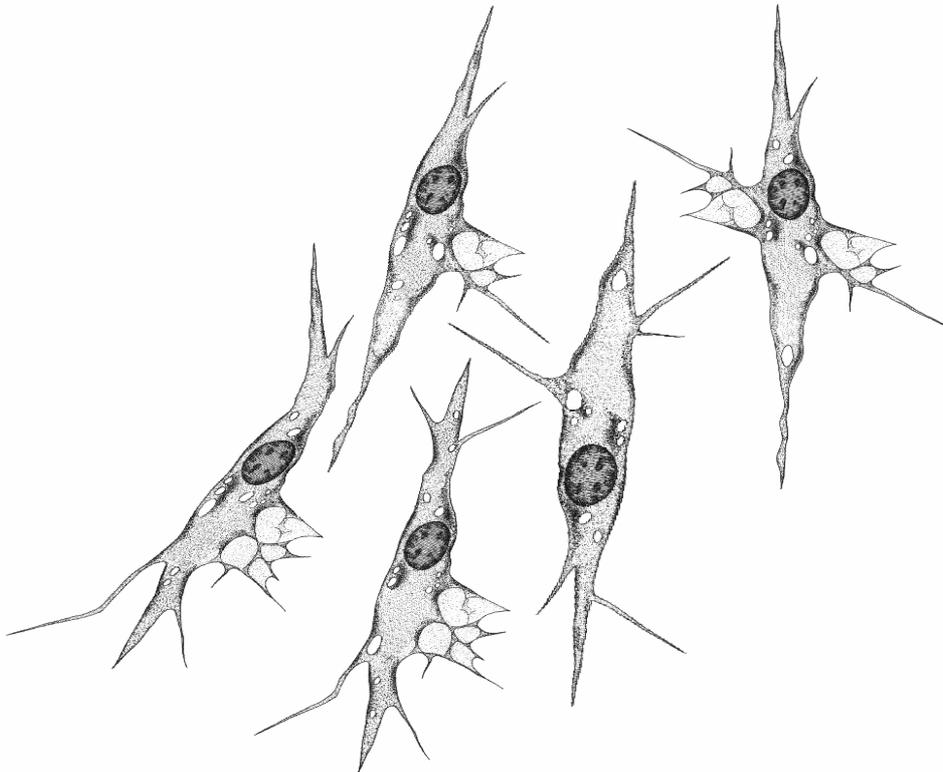
*In vivo* persistieren Chondrozyten inmitten der Knorpelmatrix. Nährstoffe und Sauerstoff gelangen ausschließlich durch Diffusion in das Knorpelgewebe. Diese diffusionslimitierte Versorgung der Zellen gilt als einer der entscheidenden Faktoren zur Aufrechterhaltung der chondrogenen Differenzierung.

Löst man Chondrozyten aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix heraus, unterliegen sie relativ schnell einem Prozess, den man als Ent- oder Dedifferenzierung bezeichnet. In Abhängigkeit von der Kultivierungsweise und -dauer kommt es dabei zu einem sukzessiven Verlust ihrer charakteristischen phänotypischen Eigenschaften [18, 23, 60, 65, 121]. Der Prozess der Entdifferenzierung ist reversibel. Entdifferenzierte artikulare Chondrozyten können unter geeigneten Kulturbedingungen, beispielsweise in Form dichter Zellaggregate, sogenannter high-density-pellets (Pelletkultur), redifferenziert werden. Die Zellen bilden hierbei ihre, zuvor verloren gegangenen, knorpelspezifischen Eigenschaften wieder aus [9, 18, 23, 65, 121]. Das Ausmaß der De- und Redifferenzierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Besondere Bedeutung kommt den Kulturbedingungen während der Expansion der Zellen zu [229].

#### **1.6.1 Morphologische Veränderungen während der Entdifferenzierung**

Typische Knorpelzellen sind regelmäßig rund bis polygonal geformt [5] und liegen größenmäßig zwischen Lymphozyten und Endothelzellen [60]. Bedingt durch ihre hohe biosynthetische Stoffwechselaktivität verfügen sie über reichlich endoplasmatisches Retikulum und einen ausgeprägten Golgiapparat [5, 39]. *In vitro* zeigen sie ein pflastersteinartiges Wachstum.

Während der Entdifferenzierung können charakteristischerweise folgende morphologische Veränderungen beobachtet werden: Die entdifferenzierten Zellen flachen sich ab und nehmen eine unregelmäßige fibroblastoide Gestalt mit langen Zytoplasmaausläufern an [5, 66, 79, 162, 197, 198, 224] (vgl. Abb. 1.3). Bedingt durch eine starke Vermehrung des Zytoplasmas kommt es zu einer Größenzunahme um das 3-10fache [5]. In Monolayerkultur bilden diese Zellen typischerweise fischzugartige Wachstumsmuster aus [5, 162, 197, 198, 224]. Unter dem Elektronenmikroskop zeigt sich eine drastische Verarmung an rauhem endoplasmatischem Retikulum und Golgiapparat als morphologisches Korrelat der reduzierten Stoffwechselaktivität [5].



**Abb. 1.3:** Entdifferenzierte Chondrozyten; Vergrößerung etwa 2000fach.

### **1.6.2 Funktionelle Veränderungen während der Entdifferenzierung**

Differenzierte Knorpelzellen sind funktionell charakterisiert durch die Biosynthese von Kollagen Typ II [8, 12, 19, 50, 66, 69, 79, 110, 114, 162, 197, 198, 204, 223, 224] und spezifischen, besonders hochmolekularen Proteoglycanen, die dazu neigen Aggregate

zu bilden [11, 12, 48, 85, 217, 223]. Des weiteren produzieren sie große Mengen an sulfatierten Glykosaminoglykanen. Diese weisen eine typische Zusammensetzung auf: viel sulfatiertes Chondroitinsulfat, ein geringer Anteil Hyaluronsäure und nur wenig Dermatan- und Keratansulfat.

Nach Entdifferenzierung produzieren die Zellen Proteine, wie sie normalerweise nur in fibrösem Gewebe gefunden werden. An Stelle von Kollagen Typ II wird Kollagen Typ I und III, in späteren Phasen auch Kollagen X gebildet [8, 12, 18, 19, 50, 52, 66, 69, 79, 110, 114, 115, 139, 162, 196, 204, 217, 223, 224, 233].

Die gebildeten Proteoglycane sind hydrodynamisch kleiner und aggregieren nicht. Die Biosynthese von Glykosaminoglykanen ist insgesamt wesentlich geringer und unterscheidet sich deutlich von differenzierten Knorpelzellen: weniger sulfatiertes Chondroitinsulfat und geringere Anteile an Hyaluronsäure sowie Keratan- und Dermatansulfat.

---

### **Einfluss verschiedener Zytokine auf den Knorpelmetabolismus**

---

<b>Katabol</b>	Interleukin-1 $\beta$ Tumor necrosis factor $\alpha$ Interleukin-17 Interleukin-18 Leukemia inhibitory factor
<b>Regulatorisch</b>	Interleukin-6 Interleukin-8
<b>Inhibitorisch</b>	Interleukin-4 Interleukin-10 Interleukin-13 Interleukin-1 receptor antagonist Interferon- $\gamma$
<b>Anabol</b>	Insuline-like growth factor 1 Transforming growth factor $\beta$ ( $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3) Fibroblast growth factors (2, 4, 8) Bone morphogenetic proteins (2, 4, 6, 7, 9, 13), GDF-5

---

**Tab. 1.2:** Am Knorpelmetabolismus beteiligte Zytokine; *GDF-5 = growth differentiation factor 5*; Nach Ref. [68].

## **1.7 Stickstoffmonoxid**

Bereits Anfang der achtziger Jahre wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen ein biologischer Mediator postuliert, der nach Stimulation durch Acetylcholin vom Gefäßendothel freigesetzt werden sollte und die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermitteln würde [64]. Wenige Jahre später gelang Arbeitsgruppen um Palmer [166, 167], Ignarro [98, 99] und Furchgott [63] der Nachweis, dass es sich bei dieser, damals als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichneten Substanz [62] um das Molekül *Stickstoffmonoxid* (NO) handelt.

### **1.7.1 Eigenschaften von NO**

NO unterscheidet sich in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften wesentlich von allen anderen bisher bekannten biologischen Mediatoren. Mit ihm wurde erstmals eine gasförmige niedermolekulare Substanz identifiziert, die im Organismus eine hormonähnliche Wirkung ausübt. Seine relativ geringe Wasserlöslichkeit von 1 bis 3mmol/l bei 20°C und 1atm [97] und seine hohe Lipophilie [13] erlauben ihm eine freie Diffusion durch Zellmembranen [203]. Im menschlichen Körper sind dadurch Reichweiten von bis zu 600µm möglich, was einer Distanz von mehreren Zellendurchmessern entspricht [209]. Begrenzt wird diese Beweglichkeit durch ein ungepaartes Elektron [208] und die damit verbundene hohe Reaktivität dieses Gasradikals. Seine Gewebehalbwertszeit beträgt nur wenige Sekunden [45, 76].

### **1.7.2 NO-Synthasen**

Im Gegensatz zu Bakterien, die NO mit Hilfe einer Nitritreduktase herstellen, wird im eukaryonten Organismus NO von komplexen Enzymen, den NO-Synthasen produziert [166, 200].

#### **1.7.2.1 Isoformen**

Zwischen 1989 und 1994 konnten drei Isoformen dieser NO-Synthasen isoliert und kloniert werden: die neuronale, die induzierbare und die endotheliale NO-Synthase (NOS). Bei der Namensgebung orientierte man sich an damals angenommenen charakteristischen Unterscheidungsmerkmalen, die beim heutigen Stand der Forschung

teilweise nicht mehr haltbar sind. Man stellte den beiden konstitutiven NO-Synthasen (eNOS, nNOS) eine induzierbare Isoform (iNOS) gegenüber. Mittlerweile ist jedoch klar, dass alle drei Isoformen sowohl durch unterschiedliche Stimuli induziert werden als auch in verschiedenen Geweben und Zellen konstitutiv exprimiert vorliegen können. Weiterhin wurde zwischen Calcium-abhängigen (eNOS, nNOS) und Calcium-unabhängigen (iNOS) Isoformen unterschieden. Für die humane Enzymfamilie hält dieses Unterscheidungsmerkmal den Erkenntnissen der aktuellen Forschung stand. Ungeachtet ihrer Bezeichnung können die verschiedenen Isoformen jedoch in einer ganzen Reihe verschiedener Gewebe bzw. Zellen nachgewiesen werden [2]. Nach heutigem Wissenstand sind die Unterscheidungskriterien der einzelnen Isoformen vielmehr in ihren Genen, ihrer Struktur und ihren Unterschieden hinsichtlich des Reaktionsablaufes zu suchen.

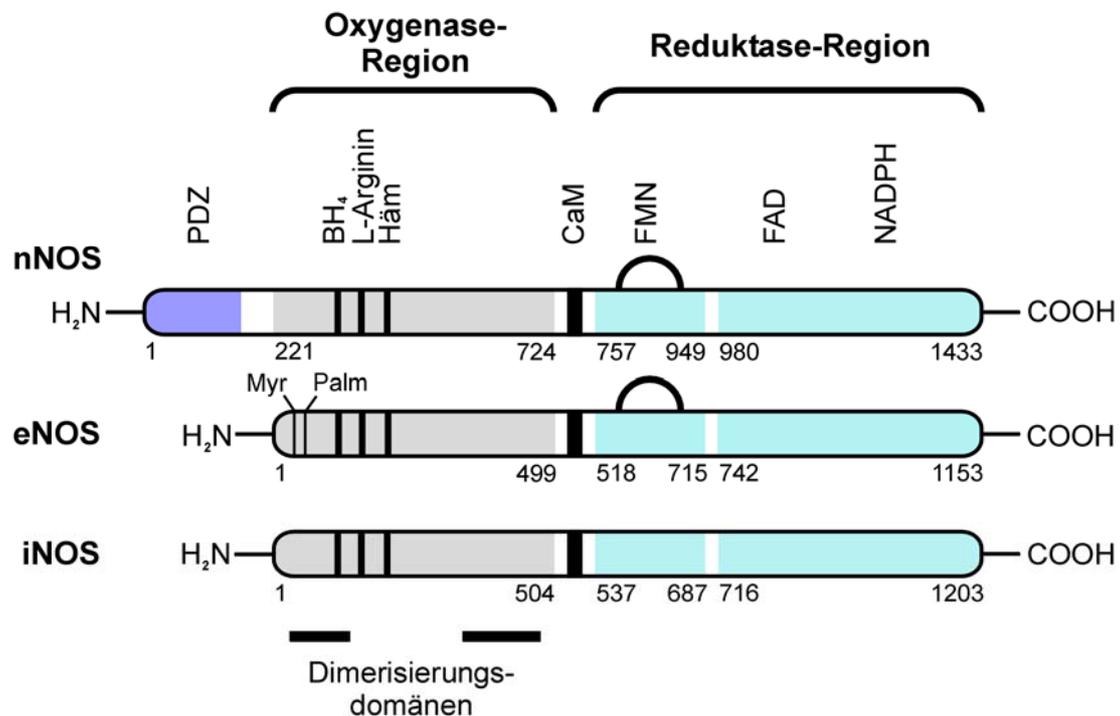
	nNOS	iNOS	eNOS
<b>Erstmals nachgewiesen in</b>	Kleinhirn	Aktivierte Makrophagen	Endothel
<b>Alternative Bezeichnungen</b>	NOS-I ncNOS bNOS	NOS-II macNOS	NOS-III ecNOS
<b>Genlokus</b>	12q24.2-12q24.3	17cen-q11.2	7q35-7q36
<b>Genstruktur</b>	29 Exons, 28 Introns	26 Exons, 25 Introns	26 Exons, 25 Introns
<b>Gengröße</b>	> 200 kbp	37 kbp	21-22 kbp
<b>Aminosäuren</b>	1434	1153	1203
<b>Molekularmasse</b>	161kDa	131kDa	133kDa
<b>V<sub>max</sub> [nmol L-Citrullin / mg/min]</b>	>300	>1600	15
<b>K<sub>m</sub> [µM] (Affinität zu L-Arginin)</b>	~2	~2,8	2,9
<b>Vorkommen (Auswahl)</b>	Neurone Quergestreifte Muskulatur	Makrophagen Hepatozyten Chondrozyten Astrozyten Glatte Muskulatur	Endothelzellen Epithelzellen Kardiomyozyten

**Tab. 1.3:** Charakteristika der NOS-Isoformen. Modifiziert nach Ref. [199].

### **1.7.2.2 Struktur**

Bei allen drei NOS-Isoformen handelt es sich um relativ große Enzyme. In ihrer aktiven Form liegen sie zudem stets als Dimer aus zwei identischen NOS-Monomeren vor. Die Struktur der NOS-Monomere lässt sich prinzipiell in eine N-terminale Oxygenase- und eine C-terminale Reduktasedomäne einteilen. Verbunden werden die beiden Domänen über den Calcium-Rezeptor Calmodulin (CaM). Die Oxygenase-Domäne besitzt Bindungsstellen für Tetrahydrobiopterin, L-Arginin und Häm, die Reduktase-Domäne für Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavin-Mononucleotid (FMN) und reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Im aktiven dimeren Zustand bindet die Oxygenase-Domäne eines Monomers an die Reduktase-Domäne eines anderen Monomers. Diese Struktur wird durch Häm, BH<sub>4</sub> und L-Arginin stabilisiert.

Zwischen den einzelnen humanen Isoformen der NOS besteht eine Aminosäurehomologie von 51 bis 57% (vgl. Abb. 1.4). Die NO-Synthasen werden von drei Single-Copy-Genen (NOS1, NOS2 und NOS3) exprimiert, deren chromosomale Lage bekannt ist (vgl. Tab. 1.3)



**Abb. 1.4:** Grundstruktur der NOS-Isoformen. Die Zahlen am Anfang und Ende jeder Domäne beziehen sich auf den jeweiligen Aminosäurerest an dieser Stelle. Für eNOS sind die Orte der Myristoylierung und Palmitoylierung, für nNOS und eNOS die autoinhibitorischen Sequenzen innerhalb der FMN-Regionen dargestellt. Die PDZ-Region (*PSD-95 disc large / ZO-1 homology domain*) der nNOS dient dazu, das Enzym an Proteine wie z. B. den NMDA-Rezeptor funktionell zu binden. Modifiziert nach [2].

### 1.7.2.3 Reaktionsablauf

In einer zweistufigen Oxidationsreaktion entsteht zunächst unter Beteiligung von Sauerstoff und NADPH als wichtige Cofaktoren aus L-Arginin das stabile Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin. In einem zweiten Schritt wird, wiederum unter dem Verbrauch von NADPH, N-Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin umgesetzt, wobei NO frei wird [75] (vgl. Abb. 1.5).

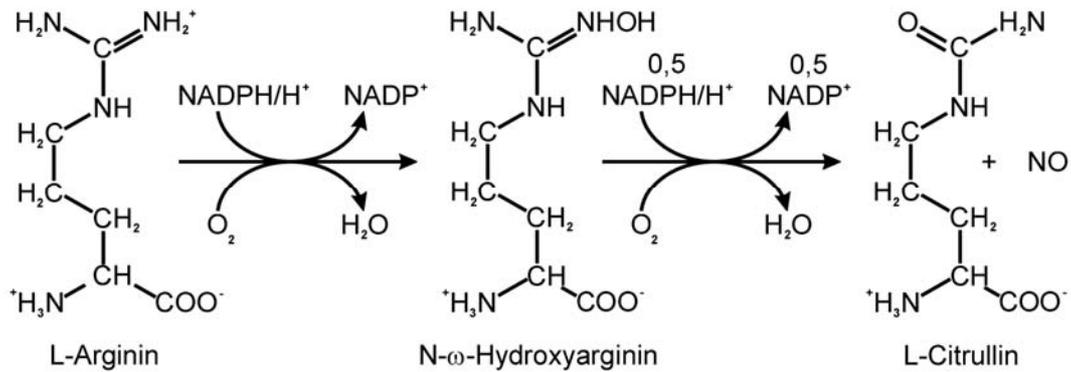


Abb. 1.5: Reaktionsgleichung der NO-Biosynthese.

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit der 3 NOS-Isoformen für L-Arginin ist unterschiedlich hoch. Mit über 1,6µmol/mg Protein/min ist sie bei der iNOS etwa 10- bis 100mal höher als bei der nNOS und eNOS.

#### 1.7.2.4 Regulation

Die NO-Bildung im Organismus wird auf zwei Arten gesteuert: Die NO-Synthasen werden in ihrer Aktivität und Expression reguliert. Die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen dabei eng an verschiedene NO-Synthase-Isoformen gekoppelt zu sein. Die nNOS und eNOS werden überwiegend in ihrer Aktivität, die iNOS überwiegend in ihrer Expression reguliert.

Die iNOS ist nach einer Induktionszeit von 4 bis 6 Stunden, unabhängig von der cytosolischen Calcium-Ionenkonzentration aktiv und kann über Stunden bis Tage NO produzieren. Die Bildungsrate der iNOS liegt etwa 10- bis 100mal höher als die der „konstitutiven“ Enzyme. Wichtige Induktoren der iNOS sind die Entzündungsmediatoren IL1β, TNFα, IFNγ sowie Bakterien und deren Abbauprodukte, wie z. B. Endotoxine (Lipopolysaccharide) [145].

	nNOS	iNOS	eNOS
<b>Expression</b>			
<b>Mechanisch (Schubspannung)</b>	-	-	Induziert
<b>TNF<math>\alpha</math>, IF<math>\gamma</math>, IL-1</b>	Hemmen	Induzieren	Hemmen
<b>Glucocorticoide, TGF<math>\beta</math>, IL-4 und -10</b>	-	Hemmen Induktion	-
<b>Aktivität</b>			
<b>Ca<sup>2+</sup>-abhängig (CaM-vermittelt)</b>	Ja	Nein*	Ja
<b>Phosphorylierung</b>	Moduliert	?	Moduliert
<b>Endogene Methylarginine</b>	Hemmen	Hemmen	Hemmen
<b>Lokalisation</b>			
<b>Myristoylation</b>			
<b>Palmitoylation</b>	-	-	Ja
<b>Caveolin-1</b>			
<b>PDZ/PSD-95</b>	ja	-	-

\*CaM bindet an NOS II konstitutiv, d. h. auch bei erniedrigtem Ca<sup>2+</sup>

**Tab. 1.4:** Regulation von Expression, Lokalisation und Aktivität der verschiedenen NOS-Isoformen.

### 1.7.3 Funktionen von NO

Seit dem erstmaligen Nachweis der endogenen Bildung und Freisetzung von NO in Säugerzellen wurde eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Wirkungen dieses kurzlebigen Gasradikals ermittelt. Im menschlichen Organismus fungiert es sowohl als parakrines Signalmolekül als auch als aggressives Effektorsystem (Zellgift) gegen Viren, Bakterien, intrazelluläre Parasiten und Tumorzellen [199]. Welche Wirkkomponente vorherrscht, hängt u. a. von der Konzentration und der Einwirkzeit von NO ab. Für die zytostatische, zytotoxische und mutagene Wirkung von NO sind deutlich höhere Konzentrationen und/oder Einwirkzeiten als für seine Botenstofffunktion notwendig.

Die Wirkung von NO wird, im Gegensatz zu anderen biologischen Mediatoren, nicht nur über ein spezifisches Rezeptorprotein, die lösliche Guanylylcyclase [101], sondern auch über die direkte Interaktion mit verschiedensten Zielproteinen (Bindung an Häm-

Gruppen mit sterischer Änderung der Häm-Konformation, Nitrosylierung oder Nitrosaminierung) vermittelt.

Die NO-sensitive Guanylylcyclase ist das am besten charakterisierte Effektormolekül, das die Wirkungen des Signalmoleküls NO vermittelt. Nach Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe der Guanylyl-Cyclase wird das Enzym aktiviert und es kommt zur vermehrten Bildung des sekundären Botenstoffs („second messengers“) zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). Dem synthetisierten cGMP stehen dann eine ganze Reihe verschiedener Effektorsysteme zur Verfügung, um die zellulären Funktionen zu beeinflussen [63, 203].

Neben seiner Funktion als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem [26], ist NO auch wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr und nimmt über eine Regulation des Gefäßtonus an der Steuerung von Herz-Kreislauffunktionen teil [199, 201, 203].

Bei den Krankheitsbildern septischer Schock [174], ischämischer Insult [58, 95, 96] und chronische Entzündung [14] spielen erhöhte NO-Spiegel aller Erkenntnis nach eine wichtige pathogenetische Rolle.

### **1.7.4 Funktion und Wirkung von NO im hyalinen Gelenkknorpel**

Im Knorpelgewebe vermittelt NO, als wichtiger parakriner Botenstoff die Signal-Transduktion unter den einzelnen Chondrozyten in der Extrazellulärmatrix, sowie zwischen den Knorpelzellen und dem knorpelumgebenden Gewebe (z.B. Synovia) [142, 161]. Für die Homöostase der wichtigen extrazellulären Matrix ist NO von entscheidender Bedeutung. Es stellt einen wichtigen Regulator im sensiblen Gleichgewicht zwischen der Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine und dem Matrixabbau dar [40, 55, 84, 211, 213, 216]. Niedrige NO-Spiegel haben, vermutlich über die NO-abhängige Induktion bestimmter Gene (z.B. *heat shock Gene*) einen protektiven Effekt auf den Chondrozyten. Hinsichtlich verschiedener Apoptose-induzierender Substanzen konnte ein protektiver Effekt von endogen oder exogen freigesetztem NO nachgewiesen werden [77, 78].

Höhere Wirkspiegel dagegen können Knorpelgewebe schädigen bzw. zerstören. Dies geschieht über verschiedene Mechanismen: NO kann in Abhängigkeit von seiner

Konzentration und Einwirkzeit in Chondrozyten Apoptose induzieren [3, 22, 82, 83, 108, 123, 168, 222]. Weiterhin hemmt es die Synthese wichtiger knorpelspezifischer Matrixproteine wie Kollagen Typ II und Aggrecan und führt zur Induktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), einer Familie von zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen, die fähig sind, alle Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen [137, 155-157]. Erhöhte NO-Spiegel spielen zudem eine Schlüsselrolle für die Pathogenese der Arthrose [4, 136, 168, 169] und der rheumatoiden Arthritis [54, 212, 214].

### **1.7.5 Bisherige Erkenntnisse zur Genexpression der NOS-Isoformen im humanen Gelenkknorpel**

Trotz der Bedeutung von NO für die Homöostase des hyalinen Gelenkknorpels ist das Wissen über die Expression der für seine Synthese verantwortlichen Enzyme noch sehr begrenzt. Von den 3 verschiedenen NOS-Isoformen wurde im humanen artikulären Chondrozyten bisher lediglich die Expression der iNOS eindeutig belegt [2, 42, 165].

Im Knorpelgewebe von Arthrose-Patienten wurde von einigen Autoren zudem die Expression einer spezifischen, der neuronalen NOS ähnlichen Isoform (osteoarthritic-NOS) postuliert [4]. Dieser Sachverhalt konnte bisher jedoch durch weitere Untersuchungen nicht bestätigt werden [142, 227].

## 2 Fragestellung

Der Einsatz von *in vitro* amplifizierten Chondrozyten zur Rekonstruktion von Knorpeldefekten ist ein erfolgversprechender experimenteller Therapieansatz. Dies gilt sowohl für die autologe Transplantation dieser Zellen als auch für ihre Verwendung zur Herstellung von Knorpelersatzgewebe *in vitro*.

Die Expansion von Knorpelzellen in Monolayerkultur ist jedoch mit dem sukzessiven Verlust ihrer charakteristischen phänotypischen Eigenschaften (Dedifferenzierung) verbunden [18, 23, 60, 65, 121]. Zur Erzielung ausreichend hoher Zellzahlen scheint dieser Prozess bisher jedoch unabdingbar [25]. Für das Rekonstruktionsergebnis ist daher die erfolgreiche Redifferenzierung expandierter Chondrozyten in funktionelle Knorpelzellen von zentraler Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es, die Genexpression humaner artikulärer Chondrozyten während deren Expansion und Redifferenzierung in einem *in vitro*-Modell mittels RT-PCR zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk wird hierbei auf die 3 NOS-Isoformen sowie die beiden Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan gelegt. In Zusatzversuchen werden funktionelle Zusammenhänge sowie regulative Abhängigkeiten auf der Ebene der Transkription untersucht. In diesem Zusammenhang sollen dabei folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welche Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase werden von humanen artikulären Chondrozyten während deren Expansion in Monolayerkultur und der anschließenden Redifferenzierung in Form dreidimensionaler Zellaggregate auf RNA-Ebene exprimiert?
- Welchen Einfluss haben TGF $\beta$  sowie die beiden proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auf die Expression der gefundenen NOS-Isoformen bzw. auf die NO-Produktion in humanen artikulären Chondrozyten?

- Hat Stickstoffmonoxid (NO) einen Einfluss auf das Redifferenzierungsverhalten expandierter humaner artikulärer Chondrozyten bzw. deren Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan?
- Wird die durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  hervorgerufene Hemmung der Expression knorpelspezifischer Matrixproteine über NO vermittelt?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Knorpelzellkultur**

##### **3.1.1 Herkunft des Knorpelgewebes**

Alle in den Untersuchungen zu dieser Arbeit verwendeten Chondrozyten wurden in nachfolgend beschriebener Technik aus humanem adultem Gelenkknorpel gewonnen. Als Ausgangsmaterial für die enzymatische Isolierung dienten Femurköpfe, die im Rahmen der operativen Versorgung von Schenkelhalsfrakturen mittels Hemi- oder Totalendoprothese in der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der chirurgischen Universitätsklinik Würzburg anfielen. Insgesamt wurden Hüftköpfe von 12 Patienten verwendet, die zuvor ihr Einverständnis hierzu erteilt hatten. Bei den Spendern handelte es sich um 6 Frauen und 6 Männer im Alter von 39 bis 91 Jahren, das Durchschnittsalter lag bei 73,2 Jahren.

##### **3.1.2 Enzymatische Isolierung humaner artikulärer Chondrozyten**

Die Hüftköpfe wurden noch im Operationssaal unter Zugabe von ausreichend isotonischer Natriumchloridlösung in einem Transportbehälter steril verpackt. Ihre weitere Aufarbeitung erfolgte in der Regel sofort, jedoch im Einzelfall spätestens 24 Stunden nach dem Eingriff. In der Zwischenzeit lagerte das Material bei +4°C im Kühlschrank.

Bei fehlerhaftem Umgang mit dem Resektat kann es leicht zu einer Infektion bzw. einer Verunreinigung der Zellkultur durch Synoviozyten oder andere Nicht-Knorpelzellen kommen. Dies legt eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte der Isolierung nahe.

Alle Arbeiten am Spendermaterial erfolgten in einer Laminar-flow-Einrichtung unter sterilen Kautelen. Nach Öffnen des Transportbehälters im Labor wurde die Kochsalzlösung vollständig abgesaugt und der Hüftkopf mit feuchten Kompressen von Anhaftungen (Gewebereste, Blutkoagel, etc.) befreit. Reste des Ligamentum capitis femoris wurden - sofern noch vorhanden - auf Niveau der Gelenkfläche reseziert. Der Femurkopf wurde anschließend in einem 250ml Becherglas 2 bis 3-mal mit 50ml PBS-Puffer gespült, um die Gelenkfläche von restlichen knorpelfremden Zellen zu säubern. Mit einem frischen sterilen Skalpell wurde der Gelenkknorpel unter präziser

Aussparung jeglichen Nicht-Knorpelgewebes in kleinen Scheibchen vom Hüftkopf abgetragen. Für einen erfolgreichen Ausgang der Isolierung sind dabei folgende Punkte von Bedeutung:

- Beim Abtragen des Knorpels muss auf die korrekte Tiefe der Schnittführung geachtet werden. Der Gelenkknorpel darf nicht zu tief abgetragen werden. Keinesfalls dürfen Teile, die an den subchondralen Knochen angrenzenden mineralisierten Knorpelschicht (Zone 4 des Arkadenschemas nach Benninghoff [15]) mit entfernt werden. Eine zu tiefe Schnittführung kann einerseits am erhöhten Widerstand, andererseits an der veränderten Schnittfläche des Gelenkknorpels bemerkt werden. Die normalerweise glasig-opake Schnittfläche weist in einem solchen Fall weißlich-matte Stellen auf.
- Der gesamte Bereich der Fovea capitis femoris sowie der periphere Übergangsbereich zur Membrana synovialis der Gelenkkapsel bleiben ausgespart.
- Pathologisch veränderter Gelenkknorpel sollte als Quelle für die Entnahme ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die gewonnenen Knorpelscheibchen wurden in eine sterile Petrischale mit Nährmedium gegeben und innerhalb der nächsten 45 Min. weiterverarbeitet. Um die Oberfläche für die später einwirkenden Enzymlösungen zu vergrößern, wurde das Knorpelgewebe in einem sterilen Glasröhrchen, unter Zusatz von 2 bis 3ml Nährmedium mit einer Schere mechanisch weiter zerkleinert. Die Zerkleinerung wurde solange fortgesetzt bis eine breiige Masse entstand, die Knorpelstückchen von maximal 1 bis 2mm Durchmesser enthielt. Mit einem Spatel wurde die Knorpelmasse anschließend in ein 100ml-Becherglas überführt.

Protease-Trockensubstanz, gewonnen aus *Streptomyces griseus*, wurde mit 15 bis 20ml Nährmedium zu einer 0,2%igen Proteaselösung vermischt und über einen Sterilfilter der Knorpelmasse zugeführt. Das Volumen der eingesetzten Proteaselösung richtete sich nach der Menge des gewonnenen Gelenkknorpels. Es wurde gerade so viel Lösung verwendet, dass alle Knorpelstückchen vollständig bedeckt waren. Die anschließende

einstündige Inkubation erfolgte bei 37°C und 150UpM auf einem Schüttler mit Inkubationshaube.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit samt aller Knorpelstückchen in ein 50ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 750 x g für 5 Min. zentrifugiert. Der gebildete Überstand wurde vollständig abgesaugt, das Sediment in ein neues 100ml-Becherglas überführt und mit 15 - 20ml einer steril gefilterten 0,025%igen Collagenase-Typ1-Lösung überschichtet. Die Inkubation dieser Suspension erfolgte wiederum bei +37°C und 150UpM. Innerhalb von 12 bis 24 Stunden wurden die Zellen vollständig aus der sie ursprünglich umgebenden Zwischenzellschicht befreit. Abschließend waren sowohl makro- als auch mikroskopisch keine Knorpelstückchen mehr sichtbar.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Pipette in ein 50ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 750 x g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus Medium, verdauter Extrazellulärmatrix und Resten des eingesetzten Enzyms wurde anschließend vorsichtig entfernt. Das während der Zentrifugation am Boden des Röhrchens entstandene Zellpellet wurde in einem definierten Volumen frischen Nährmediums aufgenommen. Es folgten Zellzählung und Tryphan-Blau-Exklusionstest. Im Anschluss daran wurden die Chondrozyten in Zellkulturflaschen ausgesät.

### **3.1.3 Zellzählung – „dye-exclusion-test“**

Zur Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen kamen eine Neubauer-Zählkammer und der Tryphan-Blau-Exklusionstest zur Anwendung [91]. 100µl Zellsuspension wurden hierzu mit der gleichen Menge Trypan-Blau vermischt, anschließend wurden jeweils 10µl dieses Gemisches zwischen Zählnetz und Deckglas der Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der Quadranten wurde die Anzahl der Zellen pro ml Suspension berechnet.

Gleichzeitig mit der Zellzählung wurde auch die Lebensfähigkeit der Chondrozyten mit dem sog. „dye-exclusion-test“ überprüft. Dieser Test beruht auf der Tatsache, dass intakte und somit teilungsfähige Zellen Farbstoffe wie Trypanblau nicht aufnehmen, während sich bei toten bzw. stark geschädigten Zellen sowohl Zytoplasma als auch Kern anfärben.

Die Zellzahl bzw. Lebendzellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}}$$

### **3.1.4 Kultivierung humaner artikulärer Chondrozyten**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen in einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen und sterilen Geräten durchgeführt.

#### **3.1.4.1 Monolayer-Kultur**

Die isolierten Chondrozyten wurden in sterilem 1x DMEM/HAM's F12 Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubationsschrank kultiviert. Um einen Befall der Zellkulturen durch Bakterien oder Pilze zu verhindern wurden der Nährlösung zusätzlich noch 100 Einheiten Penicillin, 0,1mg Streptomycin und 0,25µg Amphotericin B pro ml Medium zugesetzt. Verwendet wurden ausschließlich 75 und 150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Alle 48 Stunden wurde das verbrauchte Medium vorsichtig abgesaugt und durch 20ml frisches Nährmedium ersetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zum Erreichen der Konfluenz. Als Konfluenz bezeichnet man bei einer Zellkultur den Zeitpunkt, wenn die sich teilenden Zellen den Boden der Kulturflasche gerade flächendeckend ausfüllen. Nach Erreichen dieses Stadiums wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen möglichst vollständig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen, das die Wirkung des Trypsins abschwächen könnte. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurden anschließend jeweils 3ml (75cm<sup>2</sup>-Flasche) bzw. 5ml (150cm<sup>2</sup>-Flasche) 0,25%ige Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflaschen pipettiert. Der Ablösevorgang der Zellen wurde unter dem Durchlichtmikroskop beobachtet.

Innerhalb von normalerweise ca. 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur rundeten sich die Chondrozyten ab, lösten sich vereinzelt vom Flaschenboden und begannen in der

Trypsinlösung zu schwimmen. Durch Schlagen der Zellkulturflasche gegen die Handinnenfläche konnten die noch adhärenen Zellen mechanisch vom Flaschenboden gelöst und so die Inkubationszeit verkürzt werden. Die enzymatische Aktivität des Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von ca. 20ml Nährmedium gestoppt. Die auf diese Weise entstandene Zellsuspension wurde in 50ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 Min. bei 750 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet am Boden des Röhrchens in einer definierten Menge frischen Nährmediums aufgenommen. Abschließend erfolgten Zellzählung und Tryphan-Blau-Exklusionstest.

### **3.1.4.2 Pellet-Kultur**

In der Literatur werden verschiedene Zellkultursysteme diskutiert, die eine Redifferenzierung expandierter Chondrozyten in funktionelle Knorpelzellen ermöglichen [190]. Für eine erfolgreiche Redifferenzierung scheinen verschiedene Faktoren von besonderer Bedeutung: Eine diffusionslimitierte Nährstoffzufuhr, die perizelluläre Akkumulation der knorpelspezifischen Matrixbestandteile sowie die Möglichkeit zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten [33, 38, 49].

Eine der einfachsten Methoden, die diesen Anforderungen gerecht wird, stellt die sog. Pelletkultur dar. Dabei werden die Zellen zu einem kompakten Zellpellet hoher Dichte (high-density-pellet) zusammenzentrifugiert. In dieser Form ist expandierten Chondrozyten eine Redifferenzierung in funktionelle Knorpelzellen und die Synthese extrazellulärer Matrix möglich.

Für ein Pellet von 200.000 bis 250.000 Zellen wurde aus einer zellgezählten Suspension expandierter Chondrozyten das entsprechende Volumen in ein 15ml-Zentrifugations-Röhrchen pipettiert und dies anschließend für 5 Min. bei 750 x g zentrifugiert.

Dabei setzten sich die Zellen am Boden des spitzkegelig zulaufenden Röhrchens ab und wurden zu einem dichten Pellet zusammengelagert.

Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde dem Pellet ein chondrogenes Differenzierungsmedium (vgl. Kap. 3.11) zugesetzt. Pro Zellpellet genügten in der Regel 0,5ml des entsprechenden Mediums. Die angelegten Zellpellets wurden in den Zentrifugationsröhrchen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und wasserdampf-gesättigter

Atmosphäre inkubiert. Alle 48 Stunden wurde ein Wechsel des Differenzierungsmediums vorgenommen.

### **3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Wie andere eukaryontische Zellen können auch Chondrozyten über längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden, ohne Schaden zu nehmen.

Das Einfrieren erfolgte in 1ml Aliquots á  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen. Hierzu wurde die gewünschte Zellzahl in ein Polypropylen-Röhrchen gegeben, dieses für 5 Min. bei  $750 \times g$  zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 500µl Medium resuspendiert und zusammen mit 400µl FCS und 100µl DMSO in ein Einfrier-Röhrchen (Cryovial) überführt.

DMSO entzieht den Zellen während des Einfrierens aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften Wasser und verhindert so die Bildung zellschädigender Eiskristalle.

Die Zellen wurden zunächst im Gefrierschrank auf  $-80^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. 24 bis 48h danach wurden sie in einen speziellen Lagerbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung der konservierten Chondrozyten wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Bei Raumtemperatur besitzt das im Einfriermedium enthaltene DMSO toxische Eigenschaften. Daher sollten die Zellen unmittelbar nach dem Auftauen aus dem Wasserbad genommen und umgehend in Nährmedium ausgesät werden. Um das DMSO des Einfriermediums vollständig zu entfernen, sollte ein erster Mediumwechsel bereits nach 12 bis 24h durchgeführt werden.

### **3.2 cDNA-Zellklone**

Für die Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion zur Genexpressionsdetektion der verschiedenen NOS-Isoformen wurden vom RZPD, dem *Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenom-Projektes* in Berlin, insgesamt drei Klone aus der *I.M.A.G.E.-Klone-Kollektion* (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression Consortium; <http://image.llnl.gov>) bezogen. Es handelt sich hierbei um sog. transfizierte Bakterienzellen - E. coli - die ein rekombinantes DNA-Molekül, ein Konstrukt aus Fremd-DNA und einem Vektor enthalten. Die Fremd-DNA, in diesem Fall die cDNA-Inserts, entsprechend der mRNA-Sequenz der verschiedenen NOS-Isoformen, wurde

während der weiteren Untersuchungen als Positivprobe eingesetzt. Folgende Klone kamen in dieser Arbeit zur Anwendung:

<b>RZPD-Klon</b>	<b>cDNA-Insert</b>	<b>Vektor</b>
IMAGp998L13612	humane <i>neuronale</i> Stickstoff-Monoxid-Synthase	pT7T3
IMAGp998E09512	humane <i>induzierbare</i> Stickstoff-Monoxid-Synthase	pBluescript SK-
IMAGp998I126077	humane <i>endotheliale</i> Stickstoff-Monoxid-Synthase	pCMV-Sport 6

**Tab. 3.1:** Verwendete I.M.A.G.E.-Klone

### 3.2.1 Kultivierung und Selektion transfizierter Bakterienzellen

Die angelieferten Bakterienkulturen wurden nach Angaben des RZPDs mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausgestrichen, um Einzelklone zu selektionieren. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht in einem Inkubationsschrank.

Von jeder Agarplatte wurden am nächsten Tag einzelne Bakterienklone mit einer Impföse in 10ml-Glasröhrchen mit flüssigem LB-Medium überführt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurden den Nährmedien die entsprechenden Antibiotika in geeigneter Konzentration zugesetzt. Nach Inkubation auf einem Schüttler mit Inkubationshaube (37°C, 225UpM, über Nacht) wurde die Plasmid-DNA isoliert (vgl. Kap. 3.3) und ein Kontrollverdau durchgeführt (vgl. Kap. 3.5).

Konnte durch diese Restriktionsanalyse die Anwesenheit eines cDNA-Inserts richtiger Größe bestätigt werden, wurden mit der restlichen Kultur 100ml LB-Medium (+ entsprechendes Antibiotikum) in einem Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Inkubation dieser Kulturen erfolgte wiederum unter den oben genannten Bedingungen.

### **3.2.2 Glycerinkultur**

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden sog. Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 800µl Bakteriensuspension der LB-Kulturen entnommen, mit 200µl Glycerin versetzt und mittels eines Schüttlers sorgfältig vermischt. In Einfrier-Röhrchen wurden die Bakterien anschließend vorsichtig herabgekühlt und bei -80°C gelagert.

### **3.3 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das CONCERT Rapid Plasmid Purification System der Firma Life Technologies verwendet. Sowohl das „Mini-“, als auch das „Midiprep System“ kamen hierbei zum Einsatz. Durch diese Systeme lässt sich innerhalb kurzer Zeit genügend Plasmid-DNA in der erforderlichen Menge und Reinheit für einen Kontrollverdau oder den Einsatz in der PCR erhalten.

#### **3.3.1 Miniprep-System**

Das Miniprep-System wurde in der Arbeit verwendet um Plasmid-DNA für einen Kontrollverdau zu isolieren. So konnte vor Anlegen größerer LB-Kulturen überprüft werden, ob im Vektor das entsprechende Insert enthalten war.

Den angesetzten LB-Kulturen wurden nach Inkubation über Nacht 1,5ml entnommen, in ein 2ml-Eppendorf-Cup überführt, bei 4650 x g für 5 Min. pelletiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe der im Kit enthaltenen Reagenzlösungen nach Angaben des Herstellers isoliert. Im letzten Arbeitsschritt der Isolation wurde die DNA mit 75µl 65°C warmen TE-Buffers (im Kit enthalten) eluiert.

#### **3.3.2 Midiprep-System**

Unter Zuhilfenahme des Midiprep-Systems wurde Plasmid-DNA für die Verwendung als Positiv-Probe bei den folgenden PCR-Versuchen gewonnen. Nach Inkubation über Nacht wurden die kompletten 100ml Medium einer LB-Kultur in zwei 50ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 1600 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der Medium-Überstand wurde vollständig abgenommen. Die weitere Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Arbeitsschritt wurde die Plasmid-DNA in 500µl

TE-Buffer (im Kit enthalten) eluiert. Das DNA-haltige Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert.

### 3.3.3 Quantifizierung und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde über die Messung der optischen Dichte mit einem Photometer bestimmt. Hierzu wurde die DNA im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) verdünnt und bei 260 und 280nm vermessen. Durch den Messwert bei 260nm lässt sich die DNA-Konzentration quantifizieren. Eine  $OD_{260} = 1,0$  entspricht  $50 \mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA (Umrechnungsfaktor für 10mm Küvetten).

Zusammen mit dem Wert bei 280nm erhält man weiterhin ein Maß für die Reinheit der Plasmid-DNA. Aus den Werten bei 260 und 280nm wird der Quotient gebildet. Je näher dieser Quotient (Wert bei 260nm/Wert bei 280nm) sich dem Wert 2.0 nähert, umso geringer sind die Verunreinigungen mit Proteinen [192]. Typische Werte für den Quotienten lagen im Bereich von 1,7 - 1,9.

Formel zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

### 3.4 RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA aus Zellkulturen erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi [44] mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma QIAGEN, Hilden. Es handelte sich hierbei um ein adsorptions-chromatographisches, auf Silica-Gel Membranen basierendes Trennverfahren.

#### 3.4.1 RNA Isolation - Monolayer-Kultur

Das Nährmedium wurde vollständig aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die am Flaschenboden adhärenen Zellen mit 5ml PBS ( $37^{\circ}\text{C}$ ) gespült. In die Zellkulturflaschen wurde anschließend je 1ml RLT-Lysis-Buffer (im Kit enthalten) pipettiert und die Chondrozyten mittels eines sterilen Zellschabers vom Flaschenboden gelöst. Das so gewonnene Zelllysat wurde in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und durch intensives

Schütteln (Vortex Genie 2) homogenisiert. Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte dann nach dem Protokoll des „RNeasy-Mini-Kit“. Hierbei wurde die Gesamt-RNA im letzten Arbeitsschritt mit 40µl sterilem, RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden abschließend photometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der RNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Häufiges Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

### **3.4.2 RNA Isolation - Pellet-Kultur**

Aus den 15ml-Polypropylen-Röhrchen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die am Boden befindlichen Pellets mit 2ml PBS ( $37^{\circ}\text{C}$ ) gespült. Unter dosierter Aspiration wurde je ein Pellet mit der Spitze einer 1000ml-Pipette aufgenommen und in Tissue-Tek Gefriereinbettmedium auf den Stempel des Kryostaten aufgefroren. Bei einer Kammertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  und einer Objekttemperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  wurden die Pellets in 20µm-Schnitte zerteilt.

Eine weitere mechanische Zerkleinerung erfolgte anschließend in einem Mörser („Dismembrator S“ der Firma Braun, Melsungen). Hierzu wurden die Schnitte zusammen mit einer Metallkugel in einen speziellen Teflon-Behälter gegeben, der zuvor in flüssigem Stickstoff vorgekühlt worden war, und bei 1000UpM für zweimal 1 Min. homogenisiert. Nach Öffnen des Schüttelbehälters wurde das homogenisierte Gewebe in 1ml RLT-Lysis-Buffer des „RNeasy-Mini-Kit“ aufgenommen und in ein 1,5ml-RG überführt. Die weitere Isolation der Total-RNA wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden abschließend photometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des RNA-haltigen Eluats bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.3 Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA**

Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden am Photometer bestimmt (vgl. Kap. 3.3.3). Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1,0 entspricht 40 µg/ml Gesamt-RNA (Umrechnungsfaktor für 10mm Küvetten).

### 3.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

#### 3.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und die Phosphodiesterbindungen beider Stränge spalten können. Die Spaltung des DNA-Substrates erfolgt innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz.

#### 3.5.2 Restriktionsansatz

Für die analytische Spaltung von Plasmid-DNA wurden die Restriktionsendonukleasen EcoR I, Not I, Sal I und Xho I der Firma New England Biolabs eingesetzt. Puffer und Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Herstellerangaben gewählt. Pro  $\mu\text{g}$  zu spaltender DNA wurde dabei je eine Einheit (1U) des entsprechenden Restriktionsenzym verwendet. Eine Einheit Restriktionsendonukleaseaktivität ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die nötig ist, um  $1\mu\text{g}$  DNA des Phagen Lambda unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde vollständig zu spalten. Anschließend wurde die geschnittene DNA auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und bei 130V für 50 Min. elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Verdau wurde wie folgt durchgeführt:

#### **Zellklon "IMAGp998L13612"**

##### Pipettierschema für 15 $\mu\text{l}$ Endvolumen:

Plasmid-DNA (aus Miniprep).....	10 $\mu\text{l}$
Not I (10U/ $\mu\text{l}$ ).....	1 $\mu\text{l}$
EcoR I (10U/ $\mu\text{l}$ ).....	1 $\mu\text{l}$
Puffer.....	1,5 $\mu\text{l}$
BSA.....	1,5 $\mu\text{l}$

**Zellklon “IMAGp998E09512”**

Pipettierschema für 15µl Endvolumen:

Plasmid-DNA (aus Miniprep).....	10µl
EcoR I (10U/µl) .....	1µl
Xho I (10U/µl) .....	1µl
Puffer.....	1,5µl
BSA.....	1,5µl

**Zellklon “IMAGp998I126077”**

Pipettierschema für 15µl Endvolumen:

Plasmid-DNA (aus Miniprep).....	10µl
Sal I (10U/µl) .....	1µl
Not I (10U/µl) .....	1µl
Puffer.....	1,5µl
BSA.....	1,5µl

**3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eines der sensitivsten Verfahren zur Genexpressionsdetektion [179]. Da sich RNA nicht direkt durch Einsatz der PCR vervielfältigen lässt, muss diese vorab in DNA umgeschrieben werden, die anschließend durch die PCR amplifiziert wird.

**3.6.1 Reverse Transkription**

Den Vorgang des Umschreibens einer RNA-Matrize in eine komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet man als reverse Transkription. Erreicht wird dies durch Einsatz des Enzyms reverse Transkriptase (RTase), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Daneben werden Primer benötigt, die an die RNA hybridisieren und von der RTase mit dNTP's entlang der Matrize in 5'-3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden.

Als Primer können entweder Mischungen kurzer DNA-Hexanukleotide aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen (sog. Random-Hexamer-Primer) oder spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden.

## Material und Methoden

---

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Random-Hexamer-Primer verwendet. Als RTase wurde eine Enzymvariante der Moloney-Murine-Leukemia-Virus-reverse Transkriptase (MMLV-RTase) eingesetzt, da diese aufgrund ihrer verminderten bzw. fehlenden RNase-H-Aktivität im Gegensatz zu anderen reversen Transkriptasen in der Lage ist, auch sehr lange mRNA-Matrizen revers zu transkribieren [152].

In ein steriles, auf Eis gelagertes 0,5ml-RG wurden nachfolgend aufgeführte Reagenzien pipettiert und jeweils sorgfältig durchmischt:

### Pipettierschema für 20µl Endvolumen:

Random Hexamer Primer..... 1µl  
RNA ..... 400ng  
Aqua dest..... ad 14µl

⇒ Inkubation für 10 Min. bei 70°C im Heizblock

⇒ anschließend Inkubation für 5 Minuten auf Eis

M-MLV RT 5x Buffer ..... 4µl  
10mM dNTP-Mix ..... 1µl

⇒ Inkubation für 5 Minuten bei 42°C

M-MLV Reverse Transkriptase ..... 1µl

⇒ Inkubation für 55 Minuten bei 42°C im Heizblock

⇒ Inkubation für 10 Minuten bei 70°C im Heizblock

⇒ Abkühlung auf 4 °C, Weiterverarbeitung innerhalb weniger Stunden  
oder Lagerung bei -20 °C

### **3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase-Chain-Reaction = PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten einer definierten Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen [152-154, 191, 192]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR durchgeführt zur Amplifikation mRNA (RT-PCR, vgl. Kap. 3.6.1) sowie zur Sequenzanalyse (vgl. Kap. 3.8).

### 3.6.2.1 Prinzip der PCR

Das Prinzip der PCR beruht auf der Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Zu Beginn der PCR erfolgt eine vollständige Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch ein- bis fünfminütiges Erhitzen auf 92 bis 95°C. Während der folgenden Zyklen ist dann ein Denaturierungsschritt von wenigen Sekunden ausreichend.

Nach der Denaturierung wird die Reaktionslösung sehr schnell auf die Annealing-Temperatur von 60-40°C abgekühlt. Die beiden im PCR-Ansatz in hohem Überschuss enthaltenen Oligonukleotid-Primer können nun an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Annealing). Die optimale Annealing-Temperatur muss für jedes Oligonukleotidpaar bestimmt werden. Sie liegt ca. 5°C unter dem errechneten Schmelzwert ( $T_m$ -Wert). Als  $T_m$ -Wert bezeichnet man diejenige Temperatur (in °C), bei der 50% der Oligonukleotide gebunden sind.

Formel zur Berechnung des Schmelzwertes von Oligonukleotiden:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Die gebundenen Oligonukleotide werden von einer DNA-abhängigen thermostabilen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs) verlängert (elongiert). Die Elongation wird in der Regel bei 72°C durchgeführt. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Matrize sowie von der Prozessivität der Polymerase. Im Idealfall wird in jedem Zyklus der durch die Oligonukleotide flankierte DNA-Abschnitt verdoppelt, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz führt. Nach 30 Zyklen erhält man im Idealfall  $10^9$  Kopien.

### 3.6.2.2 PCR-Protokolle

Die PCR fand in einem Thermocycler (Thermocycler PTC-200) von MJ Research statt. Als Polymerase wurde die aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isolierte Taq-DNA-Polymerase verwendet. Als Ausgangs-DNA (Positivproben) wurden 10ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Pipettierschema für 30µl Endvolumen:

RT-Ansatz mit cDNA .....	1µl
Sense-Primer (5pmol/µl) .....	1µl
Antisense-Primer (5pmol/µl).....	1µl
10x PCR-Puffer .....	3µl
dNTP-Mix.....	1µl
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl).....	0,5µl
Aqua dest. ....	ad 30µl

Primer	nNOS (NOS I)		iNOS (NOS II)		eNOS (NOS III)	
	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]
<b>1</b>	94	3:00	94	3:00	94	3:00
<b>2</b>	94	0:30	94	0:30	94	0:30
<b>3</b>	57	1:00	56	1:00	56	1:00
<b>4</b>	72	1:00	72	1:00	72	1:00
<b>5</b>	Weitere 34 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 34 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 34 Zyklen der Schritte 2 – 4	
<b>6</b>	72	5:00	72	5:00	72	5:00
<b>7</b>	4	beliebig	4	beliebig	4	beliebig

**Tab. 3.2:** PCR-Protokolle für nNOS, iNOS und eNOS.

Primer	Aggrecan		Col1a2		Col2a1	
	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]
<b>1</b>	94	4:00	94	4:00	94	3:00
<b>2</b>	94	0:30	94	0:30	94	0:30
<b>3</b>	54	1:00	54	1:00	58	1:00
<b>4</b>	72	1:00	72	1:00	72	1:00
<b>5</b>	Weitere 24 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 34 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 24 Zyklen der Schritte 2 – 4	
<b>6</b>	72	5:00	72	5:00	72	5:00
<b>7</b>	4	beliebig	4	beliebig	4	beliebig

**Tab. 3.3:** PCR-Protokolle für Aggrecan, Kollagen Typ I und II.

Primer	GAPDH		EF1a		M13(-20)	
	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]
1	94	4:00	94	4:00	94	4:00
2	94	0:30	94	0:30	94	0:30
3	62	1:00	54	1:00	50	1:00
4	72	1:00	72	1:00	60	1:00
5	Weitere 24 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 14 Zyklen der Schritte 2 – 4		Weitere 24 Zyklen der Schritte 2 – 4	
6	72	5:00	72	5:00	72	5:00
7	4	beliebig	4	beliebig	4	beliebig

Tab. 3.4: PCR-Protokolle für GAPDH, EF1a und M13(-20).

Die verwendeten genspezifischen Primersequenzen sind in Tab. 3.5 zusammengefasst.

### 3.6.2.3 Oligonucleotide

Die Auswahl der Oligonucleotide (syn.: Primer, Oligos, Oligonucleotidmoleküle) ist entscheidend für die Effektivität und Spezifität der PCR, sowie für die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Bei der Konstruktion der Oligonucleotide wurde darauf geachtet, dass der Gehalt an den Nucleotiden Guanin und Cytosin ca. 50% betrug. Sowohl Stabilität als auch die Annealing-Temperatur der konstruierten Primer werden durch das Basenpaarverhältnis G/C zu A/T bestimmt. Weiterhin wurde beachtet, dass sowohl innerhalb eines Oligonucleotids als auch zwischen einem Primer-Paar keine komplementären Sequenzen existieren dürfen. Dies würde sonst zu sog. Hairpin-Loops bzw. Oligonucleotid-Dimeren führen, die die Effektivität deutlich negativ beeinflussen würden. Um zu unterscheiden, ob die amplifizierten Produkte von der cDNA oder von Kontaminationen mit genomischer DNA stammen, wurden die Primerpaare Intron-überspannend (d.h. die Sequenzen des Primerpaares liegen auf unterschiedlichen Exonen des Gens) gewählt. Die PCR-Produkte aus einer Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA wären so aufgrund des mitamplifizierten Introns als größere Bande erkennbar [160].

Die zur Konstruktion der Oligonucleotide benötigten Gensequenzen basieren auf der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda,

## Material und Methoden

MD, USA; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Die Spezifität der konstruierten Oligonukleotide wurde zusätzlich durch einen sog. BLAST-Search mit den entsprechenden Sequenzen auf dem Server des NCBI überprüft. Hierdurch ist ein schneller Ähnlichkeitsvergleich der Oligonukleotidsequenzen mit den in der Gendatenbank enthaltenen Sequenzen möglich. Das Ergebnis des BLAST-Search zeigt dann alle entsprechenden Sequenzen, an die der Primer hybridisieren kann. So können im Voraus mögliche Interaktionen mit genomischen intronischen Sequenzen oder anderen mRNAs überprüft und die Primer gegebenenfalls modifiziert werden. Zusätzlich zeigt das Programm die Bindungsregionen unter genauer Angabe der Basenpaarlänge auf und ermöglicht so die Größe des zu erwartenden PCR-Produktes zu ermitteln.

Primer	Sequenz	Produkt [bp]
nNOS forward nNOS reverse	5'- TGT GAT GTC TTC TGT GTG GGA GAT G -3' 5'- AGA GGC GTT GGT GGC GTG GTG GAT G-3'	431
iNOS forward iNOS reverse	5'- ACG GCG TCT GCA GCA CAT GG -3' 5'- CTTGTG GAG CAC ACG GAG CAC -3'	400
eNOS forward eNOS reverse	5'- ACG TGC ACA GGC GGA AGA TG -3' 5'- CGA AGA GCT GAG GGC TGG GTG -3'	369
Aggrecan forward Aggrecan reverse	5'- GCC TTG AGC AGT TCA CCT TC -3' 5'- CTC TTC TAC GGG GAC AGC AG -3'	392
Col1a2 forward Col1a2 reverse	5'- GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG -3' 5'- TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG -3'	461
Col2a1 forward Col2a1 reverse	5'- GAA CAT CAC CTA CCA CTG CAA G -3' 5'- GCA GAG TCC TAG AGT GAC TGA G -3'	388
GAPDH1 GAPDH2	5'- GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT -3' 5'- AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG -3'	420
EF1a1 sence EF1a1 antisence	5'- AGG TGA TTA TCC TGA ACC ATC C -3' 5'- AAA GGT GGA TAG TCT GAG AAG C -3'	235
M13(-20) forward M13 reverse	5'- CTG GCC GTC GTT TTA C -3' 5'- GTC AT C GAT GTT TCC TG -3'	243

**Tab. 3.5:** Verwendete genspezifische Primersequenzen

Sämtliche Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

### 3.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen verwendet [192]. Agarose ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid aus Meeresalgen, welches sich beim Erhitzen löst und beim Abkühlen Bündel doppelhelikaler Strukturen ausbildet. Es entsteht so ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Porengröße sich je nach eingesetzter Agarosekonzentration unterscheidet.

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern daher bei der Elektrophorese im elektrischen Feld in Richtung Anode. Je größer das DNA-Fragment, desto mehr Widerstand muss dabei auf dem Weg durch die Gelmatrix überwunden werden. Kleine DNA-Moleküle sind nach Abschluss der Elektrophorese der Anode am nächsten. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der dem Gel bei dessen Herstellung zugesetzt wird, können die an sich farblosen Nukleotidfragmente später als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich wird neben den aufzutrennenden Proben ein DNA-Standard (PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus), eine Mischung verschiedener DNA-Fragmente bekannter Länge, aufgetragen. Um den Verlauf der Elektrophorese kontrollieren zu können, enthält der Ladepuffer (loadingdye) einen niedermolekularen Farbmaler (z.B. Bromphenolblau), der mit DNA-Fragmenten von etwa 100-10bp wandert und so die Elektrophorese-Front markiert.

In Abhängigkeit von der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurden 1,0 bis 1,5g Agarose in einem Mikrowellenherd in 100ml 1xTBE aufgekocht. Diesem Ansatz wurden noch 50µg Ethidiumbromid zugegeben und die flüssige Masse in die gewünschte Form gegossen. Ein Teflon-Kamm, der ca. 5 bis 10mm vom Rand entfernt in das noch flüssige Gel gesteckt wurde, erzeugte dabei die zum späteren Auftragen der Proben notwendigen Taschen.

Nach dem Erstarren wurde das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer eingelegt und vollständig mit 1xTBE-Puffer überschichtet. In 1,5ml-Reaktionsgefäßen wurden je 15µl einer Probe mit 1,5µl DNA-Ladepuffer vermischt und neben dem Größenstandard in die Taschen des Gels pipettiert. Danach wurden die Pole der Kammer für 45 bis 90 Min. mit einer konstanten Gleichspannungsquelle verbunden. Die anzulegende Spannung und

Stromstärke richtete sich zum einen nach dem Abstand der beiden Gelkammerelektroden zueinander und zum anderen nach der beabsichtigten Auftrennungsgenauigkeit der DNA-Banden. Für die verschieden großen Gele wurden 90 bis 140V an Spannung (9 bis 10V/cm) und 240 bis 500mA an Stromstärke verwendet. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Licht Transilluminator mit einer CCD-Kamera fotografiert und digitalisiert gespeichert.

### **3.7.1 Densitometrische Auswertung von DNA-Banden**

Im Fall der iNOS-RT-PCR-Produkte erfolgte eine weitere Dokumentation und densitometrische Auswertung der aufgetrennten DNA-Banden mit Hilfe des Gelanalyse-System BioProfil (Vilber-Lourmant, Marne La Vallee, Frankreich). Hierfür wurde die Bandenintensität der iNOS-RT-PCR-Produkte mathematisch in Kurven transformiert und nach Integration der Kurvenfläche mit der Intensität der entsprechenden GAPDH-Bande (interne Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt. Es ergab sich daraus die relative iNOS-mRNA-Expression der Chondrozyten.

### **3.7.2 Statische Auswertung**

Die Statistische Auswertung der Messreihen wurde mit Hilfe des PC-Programms „Excel“ (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt. Für alle Messzeitpunkte wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet.

## **3.8 Sequenzierung von DNA**

Überprüfung der Identität der PCR-Produkte erfolgten mit einer modifizierten Kettenabbruch-Methode nach Sanger und Coulson [195]. Zur Anwendung kam hierbei der „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“. Der in diesem Kit verwendete "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix" enthält in einem geeigneten Puffer die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase.

Das Sequenzierungs-Verfahren beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid – einem sog. Terminator – abbricht.

Wird bei der Synthese ein solcher Fluoreszenz-Farbstoff markierter ddNTP-Terminator eingebaut, kann die Polymerase keine weiteren Nukleotide mehr anhängen. Grund hierfür ist das Fehlen einer freien 3'-OH-Gruppe für die Polymerisierung. Es kommt zum einem Kettenabbruch, der im Verlauf der Reaktion statistisch an jeder Stelle der zu analysierenden DNA passiert. Es entsteht also eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente, an deren Ende jeweils ein ddNTP eingebaut wurde.

Eine Markierung der 4 ddNTPs ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht, dass nach der Auftrennung der Fragmente mittels Kapillar-Gelelektrophorese die endständigen Basen detektiert werden können und somit die Nukleotidabfolge der zu sequenzierenden DNA ermittelt werden kann. Die unterschiedliche Farbstoffmarkierung birgt zudem den Vorteil, dass pro Sequenzierungsreaktion nur ein Reaktionsansatz erstellt werden muss.

### 3.8.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktionen wurden wie folgt in 0,5-ml-PCR-RGs pipettiert:

Pipettierschema für 20µl Endvolumen:

Template DNA.....	200 - 500ng
Primer (5pmol).....	1µl
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix.....	8µl
Aqua dest. ....	ad 20µl

Die zyklische Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms durchgeführt:

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Schritt 1	94°C	4:00 min
Schritt 2	94°C	0:30 min
Schritt 3	50°C	1:00 min
Schritt 4	60°C	1:00 min
Schritt 5	weitere 24 Zyklen der Schritte 2 bis 4	
Schritt 6	72°C	5:00 min
Schritt 7	Herunterkühlen auf 4°C	

**Tab. 3.6:** Temperaturprogramm der Sequenzierungsreaktion.

### 3.8.2 Aufreinigung der PCR-sequenzierten Proben

Vor der weiteren Analyse mussten die überschüssigen Fluoreszenz-markierten Terminatoren aus dem Produkt der Sequenzierungsreaktion entfernt werden. Die Ansätze wurden hierzu über Sephadex Säulen (AutoSeq G50) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte eine Ethanol-fällung. Dazu wurde das gesamte Volumen des Reaktionsansatzes in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 8,1µl 3M Natriumacetat (pH 4,3), 60µl Aqua dest. und 220µl 100%igem Ethanol (RT) versetzt und in einem Laborschüttler vermischt.

Durch 5minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation (10 Min., 16000 x g, RT) wurden die DNA-Fragmente präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für ca. 10 Min. vollständig getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wurde die Probe in 25µl TSR-Puffer aufgenommen, für 3 Min. bei 94°C inkubiert und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

### 3.8.3 Computergestützte Sequenzanalyse

Im ABI Prism 310 Genetic Analyser wurden die beim Kettenabbruch entstandenen, unterschiedlich langen DNA-Fragmente mittels einer vollautomatischen Kapillar-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei diesem Verfahren werden die Produkte der Sequenz-PCR durch einen Laserstrahl angeregt und können so von einer CCD-Kamera detektiert werden. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm „Sequencing Analysis 3.4“ analysiert. Datenbankrecherchen, basierend auf

Nukleinsäuresequenzen, wurden mit dem NCBI Sequence Viewer (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) durchgeführt.

### **3.9 Quantifizierung der NO-Produktion**

#### **3.9.1 Griess-Reaktion**

Das zellulär gebildete NO diffundiert leicht aus den Zellen heraus und oxidiert extrazellulär innerhalb weniger Sekunden in seine Folgeprodukte Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^{2-}$ ). Die NOS-Aktivität erfolgte über den Nachweis von Nitrit im zellfreien Kulturüberstand der Pellets anhand der sog. Griess-Reaktion [74]. Hierbei entsteht in einer zweischrittigen Reaktion mit den beiden Griess-Reagenzien ein Azoprodukt, das bei einer Wellenlänge von 540nm ein Absorptionsmaximum aufweist und somit photometrisch erfasst werden kann.

Da Nitrit liegt im Kulturmedium hauptsächlich in oxidiert Form als Nitrat vor. Zur spektralphotometrischen Untersuchung muss es daher zunächst vollständig zu Nitrit reduziert werden. Hierzu wurden 500 $\mu\text{l}$  Kulturmedium für 5 Min. bei 4650 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 250 $\mu\text{l}$  Nitratreduktase versetzt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem so vorbehandelten Kulturmedium wurden 100 $\mu\text{l}$  entnommen, in eine Photometer Küvette überführt und mit 100 $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz (50 $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz 1 + 50 $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz 2) gemischt. Anschließend wurde nach 10 Min. die Extinktion bei 540nm am Photometer bestimmt. Die  $\text{NO}_2^-$  Konzentration errechnet sich anhand einer Standardkurve (0 $\mu\text{M}$  – 100 $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  in chondrogenem Differenzierungsmedium). Hierbei wurde die Verdünnung durch Zugabe der beiden Griess-Reagenzien sowie der Nitratreduktase berücksichtigt.

Griess-Reagenz 1: 1% Sulphanilamid in 5%ige Phosphorsäure

Griess-Reagenz 2: 0,1% N-(1-Naphthyl)ethylendiamin in 5%ige Phosphorsäure

#### **3.9.2 Statistische Auswertung**

Die Statistische Auswertung der Messreihen der Griess-Reaktion wurde mit Hilfe des PC-Programms „Excel“ (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt.

Für alle Messzeitpunkte wurden für den Parameter Nitritgehalt jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Um statistisch signifikante Aussagen bezüglich der erhaltenen Daten machen zu können wurde der t-Test für unverbundene Datensätze durchgeführt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als signifikant, bei  $p < 0,01$  als sehr signifikant und bei  $p < 0,001$  als hoch signifikant bewertet.

### **3.10 Histochemie und Immunhistochemie**

#### **3.10.1 Aufarbeitung der Zellpellets für Kryostatschnitte**

Aus den zur Kultivierung verwendeten Polypropylen-Röhrchen wurde das Differenzierungsmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets kurz mit PBS (37°C) gespült. Anschließend wurden sie in 1x1x2,5cm großen Kunststoffgefäßen mit Tissue-Tek Gefriereinbettmedium bedeckt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung lagerten die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank. Das tiefgefrorene Gewebe wurde vor dem Schneiden nicht wieder aufgetaut.

#### **3.10.2 Schnitte am Kryostaten**

Für histochemische und immunhistochemische Färbungen wurden von den gefrorenen Zellpellets Seriengefrierschnitte angefertigt. Das eingebettete Gewebe wurde hierzu mit etwas Tissue-Tek auf den Stempel eines Kryostaten aufgefroren und bei einer Kammertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  und einer Objekttemperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  in 14 $\mu\text{m}$  starke Serienschnitte zerteilt. Diese wurden direkt auf geeignete Objektträger aufgezogen und durch Trocknen (12 bis 24 h bei RT) auf diesen fixiert. Die getrockneten Schnitte wurden anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **3.10.3 Histochemie - Alzian-Blau-Färbung**

Alzian ist ein Farbstoff der spezifisch die Sulfatgruppen der sulfatierten Glykosaminoglykane in der Extrazellulärmatrix blau markiert [118]. Zellkerne hingegen bleiben ungefärbt. Zwecks besserer Kontrastierung wurden die Zellkerne mit Kernechtrot gegengefärbt.

### 3.10.3.1 Protokoll der Alzian-Blau-Färbung

- 2 Min. 3%ige Essigsäure
- 10 Min. Alzian-Blau 0,1%
- kurz mit Aqua dest. spülen
- 5 Min. Kernechtrot-Färbung
- kurz mit Aqua dest. spülen
- Entwässerung mit aufsteigender alkoholischer Reihe:
  - 1 bis 2 Min. 99%igen Alkohol
  - 1 bis 2 Min. 100%igen Alkohol
  - 5 Min. Xylol I
  - 5 Min. Xylol II
- Eindecken mit Entellan-Schnelleindeckmittel

### 3.10.3.2 Auswertung der Alzian-Blau-Färbung

Die Intensität Färbung wurde anhand eines Auswertungsschemas semiquantitativ erfasst. Die Auswertung repräsentativer Sichtfelder erfolgte am Mikroskop bei 200facher Vergrößerung.

---

#### Auswertung der Alzian-Blau-Färbung

---

-	Keine Anfärbung
+/-	Vereinzelte bis mäßige Anfärbung
+	Positive Reaktion
++	Stark positive Reaktion

---

**Tab. 3.7:** Auswertungsschema der Alzian-Blau-Färbung.

### 3.10.4 Immunhistochemie für Kollagen Typ II

Das Prinzip immunhistologischer Untersuchungen besteht darin, dass Antikörper zum Einsatz kommen, an die Farbstoffe oder Enzyme gekoppelt sind. Die Enzyme dienen in diesem Fall dazu, eine Reaktion zu katalysieren, an deren Ende ein Farbstoff als Ergebnis steht. Die Farbstoffe können lichtmikroskopisch nachgewiesen werden und

zeigen aufgrund der Spezifität der Antikörper die Lokalisation des zu untersuchenden Antigens an.

In dieser Studie kam an Gefrierschnitten von Zellpellets ausschließlich die indirekte Immunperoxidase-Methode zur Anwendung. Diese verfügt im Vergleich zu den direkten Techniken über eine deutlich höhere Nachweisempfindlichkeit.

Die Präparate wurden nach dem Auftauen zunächst mit einer Lösung überschichtet, die einen nicht markierten bzw. nicht konjugierten Antikörper (Primärantikörper) gegen das Gewebeanigen enthielt. Nach Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte mit Tris-Puffer (pH 7,4) gespült um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte eine erneute Überschichtung mit einer Lösung in der sich ein 2. Antikörper befand. Dieser Sekundärantikörper war spezifisch gegen den im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Primärantikörper gerichtet und mit einer Peroxidase konjugiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Präparate wiederum in Tris-Puffer gewaschen und mit einem 3. Antikörper überschichtet.

Bei diesem Tertiärantikörper handelte es sich ebenfalls um einen Peroxidase-konjugierten Antikörper. Er erkennt und bindet auf dem Präparat spezifisch den Sekundärantikörper.

Für die Farbreaktion wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in 10ml PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst und die vorher in Tris-Puffer gewaschenen Schnitte für 2 Min. damit überschichtet. Im Anschluss an die Substratentwicklung wurden die Objektträger in Aqua dest. gewaschen, um nicht verbrauchtes DAB zu entfernen.

Nach 4-minütiger Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung wurden die Schnitte 10 Min. unter laufendem Leitungswasser gespült und anschließend mit Glyceringelatine eingedeckt. Die nachzuweisenden Antigene stellten sich bei dieser Technik als braune Präzipitate dar.

### **3.10.4.1 Antikörper**

Die lyophilisierten Antikörper wurden entsprechend der Herstelleranweisung in Aqua dest. aufgelöst, in entsprechenden Mengen aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Folgende Antikörper wurden in der Immunhistochemie eingesetzt:

## Immunhistochemie Kollagen II

Antikörper	Produkt/Hersteller	Verdünnung
Primär-AK	Anti-Kollagen II: monoklonaler Maus anti-humaner- Kollagen-II-Antikörper Chemicon International, Hofheim, Deutschland	1:100
Sekundär-AK	Anti-Mouse: Peroxidase-konjugierter Kaninchen anti- Maus-Antikörper, monoklonal DAKO A/S, Dänemark, Code No. Z0109	1:50
Tertiär-AK	Anti-Rabbit: Peroxidase-konjugierter Ziege anti- Kaninchen-Antikörper, monoklonal DAKO A/S, Dänemark (Code No. P0448)	1:50

**Tab. 3.8:** Verwendeter Primär-, Sekundär- und Tertiär-Antikörper für die Kollagen Typ II-Immunhistochemie.

Sowohl Sekundär- als auch Tertiärantikörper wurden kurz vor dem Aufbringen auf das Präparat mit AB-Plasma und PBS-Puffer angesetzt. 20µl eines lyophilisierten Antikörpers wurden mit 300µl AB-Plasma und 700µl PBS (pH 7,4) vermischt.

### 3.10.4.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

- 3x mit Tris-Puffer waschen
- Vorbehandlung: Pepsin für 2 Min.
- 3x mit Tris-Puffer waschen
- 1. Antikörper über Nacht (feuchte Kammer, 4°C)
- 3x mit Tris-Puffer waschen
- 2. Antikörper 30 Min. (feuchte Kammer, RT)
- 3x mit Tris-Puffer waschen
- 3. Antikörper 30 Min. (feuchte Kammer, RT)
- 3x mit Tris-Puffer waschen
- DAB-Reaktion 2 Min.
- 3x mit Aqua dest. waschen
- Hämalaun 4 Min.

## Material und Methoden

---

- 10 Min. fließend wässern (Leitungswasser)
- kurz in Aqua dest. spülen
- Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine

### 3.10.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Intensität der immunhistochemischen Reaktivität wurde am Mikroskop bei 200facher Vergrößerung in repräsentativen Sichtfeldern semiquantitativ erfasst.

---

#### Auswertung der immunhistochemischen Färbung

---

-	Negative Reaktion
+/-	Vereinzelte bis mäßige Reaktion
+	Positive Reaktion
++	Stark positive Reaktion

---

**Tab. 3.9:** Auswertungsschema der immunhistochemischen Färbung.

## 3.11 Medien für die Zellkultur

### Nährmedium

Pipettierschema für ca. 555ml Endvolumen:

DMEM/HAM's F12 .....	500ml
FCS .....	50ml
Penicillin* .....	50.000U
Streptomycin* .....	50mg
Amphotericin B* .....	125µg

\* enthalten in 5ml Antibiotic Antimycotic Solution (100x)

**Differenzierungsmedium (chondrogene Differenzierung)**

Pipettierschema für ca. 50ml Endvolumen:

DMEM.....	50ml
Dexamethason .....	5µl
Ascorbat-II-Phosphat.....	50µl
Pyrovat.....	50µl
Prolin .....	50µl
ITS+1 .....	0,5µl
rhTGFβ1 .....	50µl
Penicillin*.....	5.000U
Streptomycin* .....	5mg
Amphotericin B* .....	12,5µg

\* enthalten in 0,5ml “Antibiotic Antimycotic Solution” (100x)

Der Bedarf an chondrogenem Differenzierungsmedium kann ohne Zusatz von rhTGFβ1 für 3 Wochen im Voraus angesetzt werden. Bis zum Gebrauch erfolgt die Lagerung des Mediums bei +4°C im Kühlschrank. Vor der Verwendung muss dem benötigten Volumen dann noch 1µl rhTGFβ1 pro ml Medium zupipettiert werden.

**Einfriermedium**

Pipettierschema für 1000µl Endvolumen:

Zellsuspension.....	500µl
FCS (hitzeinaktiviert).....	400µl
DMSO .....	100µl

**LB-Medium**

Pipettierschema für 1000ml Endvolumen:

Trypton .....	10g
Hefeextrakt .....	5g
NaCl.....	5g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O .....	2,5g
Aqua bidest.....	ad 1000ml
⇒ auf pH 7,5 einstellen	
⇒ anschließend autoklavieren	

**3.12 Puffer und Lösungen**

**TBE-Puffer (pH 8,2)**

Pipettierschema für 1000ml Endvolumen:

TRIS .....	500mM
Borsäure.....	500mM
EDTA .....	20mM
A. bidest.....	ad 1000ml
⇒ mit NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 einstellen	
⇒ anschließend autoklavieren	

**PBS-Puffer (phosphat buffered saline)**

Pipettierschema für 1000ml Endvolumen:

NaCl.....	8g
KCl .....	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O.....	0,2g
A. bidest.....	ad 1000ml
⇒ mit NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 einstellen	
⇒ anschließend autoklavieren	

**6-fach Ladepuffer (6x loading dye)**

Pipettierschema:

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylene cyanol

30% Glycerol

⇒ in Aqua dest. Lösen

**3.13 Material**

**3.13.1 Verwendete Geräte**

Analysewaagen	Kern EW6000-1M, Gottlieb Kern und Sohn, Albstadt Kern 770-14, Gottlieb Kern und Sohn, Albstadt
Autoklav	H+P Varioklav Dampfsterilisator Typ 400E, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektrophoresekammer	OWI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Gas-Sicherheitsbrenner	Schütt flammy S, Schütt Labortechnik, Göttingen
Gefriermikrotom	MICROM HM 500 OM, MICROM International, Walldorf
Gefrierschrank -20°C	Bosch economic, R. Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -80°C	Harris SLT -3LS, Frigomed, Würzburg
Gelanalyse-System	BioProfil, Vilber-Lourmant, Marne La Vallee, Frankreich
Glaswaren	Schott Glas, Mainz
Heizblock	Grant-Boekel BBD2, Grant Instruments Ltd., Cambridge, England
Homogenisator	Braun Dismembrator S, B. Braun Biotech Int., Melsungen
Inkubationsschrank	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Kühlschrank +4°C	Bosch economic cooler, R. Bosch GmbH, Gerlingen- Schillerhöhe
Magnetrührer	GLW M32, Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Mikroskope	Zeiss Axiovert 25, Carl Zeiss, Göttingen Zeiss Axioskop, Carl Zeiss, Göttingen
Mirkowellengerät	Panasonic NN 3206, Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg
PCR-Gerät	Thermocycler PTC-200, MJ Research, Waltham, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,5ml	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg

## Material und Methoden

pH-Meter	WTW InoLab pH Level 1, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	accu-jet, Brand, Wertheim a. Main
Schüttler mit Inkubationshaube	Schüttler: Bühler KS-15 Inkubationshaube: Bühler TH-15 Johanna Otto GmbH, Hechingen
Sequenzier	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsquelle	Consort E835, Turnhout, Belgien
Sterilbank	Heraeus HV 2460, Kendro Laboratory Products, Hanau Heraeus HV 2472, Kendro Laboratory Products, Hanau
Stickstofftank	Air Liquide Cryogenie Arpege 110, Paris, Frankreich
Trockenschrank	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
UV-Tisch	UVP Ultraviolet Transluminator, Ultra-Violet Products, Cambridge, England
Vakuumpumpe	Vacuubrand MZ 2C, Vacuubrand, Wertheim a. Main Vacuubrand BVC 21, Vaccubrand, Wertheim a. Main
Vakuumzentrifuge	Savant Speed Vac SC110, GMI, Albertville, USA
Vortexgerät	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Memmert WBU 45, Memmert, Schwabach GFL Typ 1001, Gesellschaft für Labortechnik, Hannover - Vinnhorst
Zählkammer	Hecht-Assistent Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Zentrifugen	Heraeus Labofuge 400R, Heraeus Biofuge fresco, Heraeus Biofuge pico, Heraeus Biofuge primo R, Kendro Laboratory Products, Hanau

**3.13.2 Enzyme**

DNA-Polymerase	Ampli Taq DNA-Polymerase, Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien Taq Polymerase, 5.000 U/ml, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Kollagenase	Collagenase Type I (Clostridiopeptidase A), SIGMA-Aldrich, Steinheim
EcoR I	New England Biolabs, Beverly, USA
Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/μl, Promega, Medison, USA
Not I	New England Biolabs, Beverly, USA
Protease	Protease, SIGMA-Aldrich, Steinheim
Sal I	New England Biolabs, Beverly, USA
Xho I	New England Biolabs, Beverly, USA

**3.13.3 Kit-Systeme**

Sequenzierung von DNA	Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Darmstadt
Isolation von Plasmid-DNA	CONCERT Rapid Plasmid Purification System, Life Technologies, Carlsbad, USA
RNA-Isolation	RNeasy Mini-Kit, Quiagen, Hilden

**3.13.4 Verwendete Produkte**

Aceton p.a.	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma, Deisenhofen
Auslaufpipetten 1, 2, 5, 10, 25ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
AutoSeq G-50 columns	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
DAB, Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets (DAB Peroxidase Substrate)	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason (9α-Fluoro-16α-Methylprednisolon)	Sigma, Deisenhofen
DMEM/HAM's F12	PAA Laboratories, Linz, Österreich

## Material und Methoden

EDTA	Fulka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid Stammlösung 10mg/ml	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	Life Technologies, Carlsbad, USA
Formaldehyd-Lösung	Sigma, Deisenhofen
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma, Deisenhofen
Kaisers® Glyceringelatine	Sigma, Deisenhofen
Kanülen, steril	BD Microlance, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Lipopolysaccharide aus <i>S. typhosa</i>	Sigma, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
M-MLV RT 5x Buffer	Promega, Medison, USA
N-(1-Naphthyl)-ethylen- diamindihydrochlorid	Merck, Darmstadt
N <sup>G</sup> -Amino-L-arginine Hydrochlorid	Alexis, Grünberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Nitratreduktase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Parafilm	American National Can Company, Meuasha, USA
PCR Nucleotid Mix	Promega, Medison, USA
Pd(N) <sub>6</sub> "Random Hexamer" 5'- Phosphat	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA
Polypropylenröhrchen 50ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Polypropylenröhrchen 15ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
rhTGF-β1 (transformierender Wachstumsfaktor-beta1)	R and D Systems, Minneapolis, USA
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## Material und Methoden

Spritzen 5ml, 10ml	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell, Einbeck
Sulfanilamid	Merck, Darmstadt
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tissue-Tek-Gefriereinbettmedium	O.C.T., Miles, Elkhart, USA
TNF $\alpha$	R and D Systems, Minneapolis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Deisenhofen
Trypsin-EDTA Solution (10x)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Wasser bidestilliert	AppliChem, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen T <sub>75</sub> , T <sub>150</sub>	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
100bp DNA-Leiter Plus	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenmaterial

Insgesamt wurden für die beschriebenen Versuche Hüftköpfe von 12 Patienten verwendet. Bei den Spendern handelte es sich im Einzelnen um 6 Frauen und 6 Männer im Alter von 39 bis 91 Jahren, das Durchschnittsalter lag bei 73,2 Jahren.

Bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten lag als Ursache für die Fraktur des coxalen Femurendes ein Sturz aus Körperhöhe vor.

Spender					
Nr.	Alter [J]	Geschlecht	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Unfall	Besonderheiten
1	95	♀	25,6	1	Hyperthyreose
2	79	♀	27,7	1	
3	77	♂	31,7	2	Adipositas Grad I
4	76	♂	25,4	1	
5	68	♀	27,5	1	Osteoporose, Bisphosphonat
6	91	♀	22,1	1	Osteoporose, Bisphosphonat
7	87	♀	24,1	1	IDDM
8	39	♂	24,7	3	
9	42	♂	26,2	3	
10	71	♂	26,6	2	
11	82	♀	26,2	1	dialysepflichtige Niereninsuffizienz, IDDM
12	71	♂	24,1	1	
Ø 73,2		6x ♀, 6x ♂	26,0		

Unfall: 1: Sturz aus Körperhöhe, 2: Sturz aus Höhe > 2m, 3: Hochrasanztrauma

**Tab. 4.1: Spenderkollektiv**

Insgesamt wurden Hüftköpfe von 12 Patienten verwendet, 6 Frauen und 6 Männer im Alter von 39 bis 91 Jahren, das Durchschnittsalter lag bei 73,2 Jahren. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten lag als Ursache für die Fraktur des coxalen Femurendes ein Sturz aus Körperhöhe vor.

<b>Assays</b>												
<b>Chondrozyten von Spender Nr.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
PCR NOS-Isoformen	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PCR Kollagen II	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PCR Kollagen I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PCR Aggrecan	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PCR GAPDH	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Immunhistochemie Kollagen II	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alcian-Blau-Färbung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Einfluss von rhIL-1 $\beta$						X		X	X			X
Einfluss von rhTNF $\alpha$						X		X	X			X
Einfluss von rhTGF $\beta$				X								X
Inhibition der NOS (L-NAA)				X		X	X					X
NO-Donor (DETA-NONOate)				X		X	X					X

Tab. 4.2: Verwendete Assays

## 4.2 Zellmorphologie und Wachstumsverhalten

### 4.2.1 Monolayerkultur

In Vorversuchen wurde die optimale Aussaatdichte für Monolayerkulturen humaner artikulärer Chondrozyten ermittelt. Getestet wurden Zellkonzentrationen zwischen  $1,5 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen/150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche. Die optimale Aussaatdichte lag für Primärkulturen von 21tägiger Dauer bei  $5 \times 10^5$  Zellen/150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (ca. 3300 Zellen/cm<sup>2</sup>). Hier zeigten die Knorpelzellen die höchste Proliferationsrate.

Nach erfolgreicher Isolierung wurden je  $5 \times 10^5$  Chondrozyten zusammen mit 20ml Nährmedium in 150cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Großteil der Zellen war nach bereits 12 Stunden am Boden der Zellkulturflaschen adhärent. Während der ersten 48h behielt die Mehrzahl von ihnen ihre abgerundete Gestalt bei. In den folgenden 24 bis 72 Stunden zeigte sich eine ausgeprägte Abflachung und Ausbreitung der Zellen (Spreading). Die Chondrozyten nahmen im weiteren Verlauf eine abgeflachte, spindelförmige Gestalt mit langen irregulären zytoplasmatischen Fortsätzen an. Unter dem Mikroskop war nach 14 bis 21 Tagen regelmäßig ein fischzugartiges

Wachstumsverhalten zu erkennen. Ausgeprägte fischzugartige Formationen aus langen spindelförmigen Zellen gingen dabei teilweise in bizarre Wirbelformationen über.

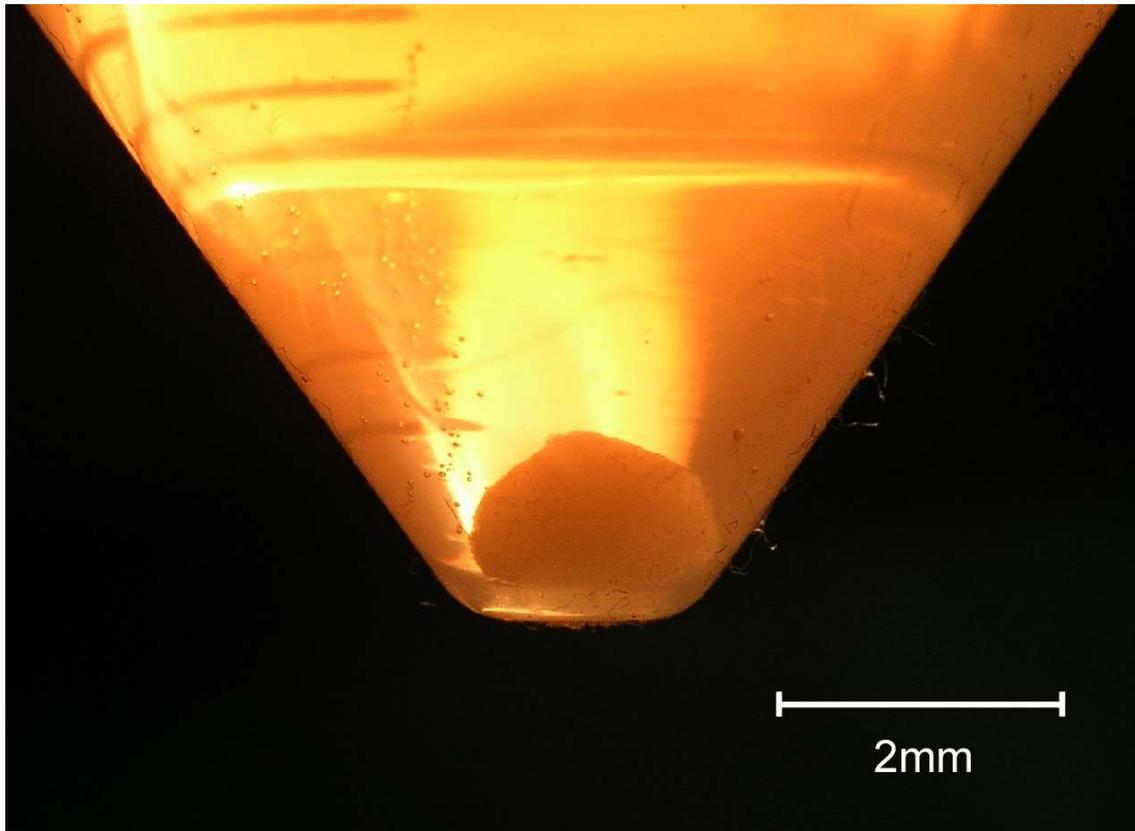
Für alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden nur Zellen aus Primärkulturen verwendet. Die isolierten Chondrozyten wurden also stets nur bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Subkulturen wurden nicht angelegt.

### **4.2.2 Pelletkultur**

Beim Anlegen der Pelletkulturen wurden 250.000 expandierte Zellen durch Zentrifugation in einem Polypropylenröhrchen zu dichten Zellaggregaten zusammengelagert. Diese primär diskoiden Zellpellets nahmen nach 36 bis 48 Stunden zunehmend sphäroide Gestalt an. Nach spätestens 72 Stunden lösten sie sich vom Boden des spitzkegelig zulaufenden Röhrchens ab.

Während der 21tägigen Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium war makroskopisch regelmäßig eine deutliche Volumenzunahme der Zellpellets feststellbar. Auch die mechanische Belastbarkeit der Zellaggregate nahm mit Dauer der Kultivierung deutlich zu. Nach 7tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium konnten die Zellpellets noch durch mehrminütige Behandlung in einem Laborschüttler (Vortex Genie 2) in zahlreiche Fragmente aufgelöst werden. Das Aufschließen länger kultivierter Pellets war stets nur noch durch Einsatz anderer Methoden möglich: Die Zellpellets mussten am Kryostaten zerteilt und die erhaltenen Gefrierschnitte anschließend mit einem Homogenisator aufgebrochen werden.

Eine Erhöhung der Zellzahl auf bis zu  $2 \times 10^6$  Zellen pro Pellet erwies sich in Vorversuchen als nicht vorteilhaft. Solche Zellaggregate erschienen bei der histologischen Aufarbeitung durchweg deutlich inhomogen. Es konnte ein dreischichtiger, konzentrischer Aufbau aus einer äußeren Zone, einer Intermediärzone und einer zentralen Nekrosezone beobachtet werden. Während in der äußeren Zone runde vitale Zellen dominierten herrschten in der zentralen Nekrosezone abgestorbene Zellen und Zelltrümmer vor. Eine Zellzahl von 250.000 pro Pellet wurde daher in allen Experimenten dieser Arbeit strikt eingehalten.

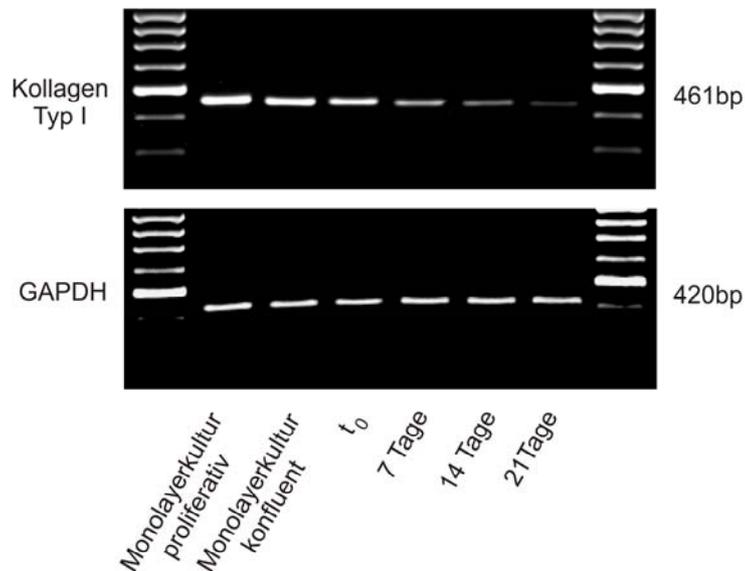


**Abb. 4.1: Photographie eines Zellpellets**

Makroaufnahme eines Zellpellets nach 21tägiger Reaktivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium.

### 4.3 Kontrolle der Differenzierungsbedingungen durch Markeranalyse

#### 4.3.1 Kollagen Typ I



**Abb. 4.2: Agarose-Gelelektrophorese - Kollagen Typ I und GAPDH**

Expression von Kollagen Typ I während der Amplifikation der isolierten Chondrozyten in Monolayerkultur und der anschließenden Redifferenzierung in Pelletkultur. Sukzessive Abnahme der Expressionsstärke von Kollagen Typ I im Zeitverlauf bei konstanter Expression von GAPDH. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

Analog zur Analyse von Aggrecan wurde bei allen Spendern (n = 12) auch die Kollagen Typ I-Genexpression untersucht. In Chondrozyten der Monolayerkultur wurde das Kollagen Typ I-Gen stark exprimiert. Für die proliferierende Zellkultur fand sich eine höhere Expressionsstärke als für Zellen des gleichen Spenders nach Erreichen der Konfluenz. Im Zeitverlauf der Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium in Form dichter Zellpellets konnte eine sukzessive Abnahme der Bandenstärke registriert werden. Bei Abschluss der Redifferenzierung nach 21 Tagen war nur noch eine minimale Genexpression von Kollagen Typ I nachweisbar.

### 4.3.2 Kollagen Typ II

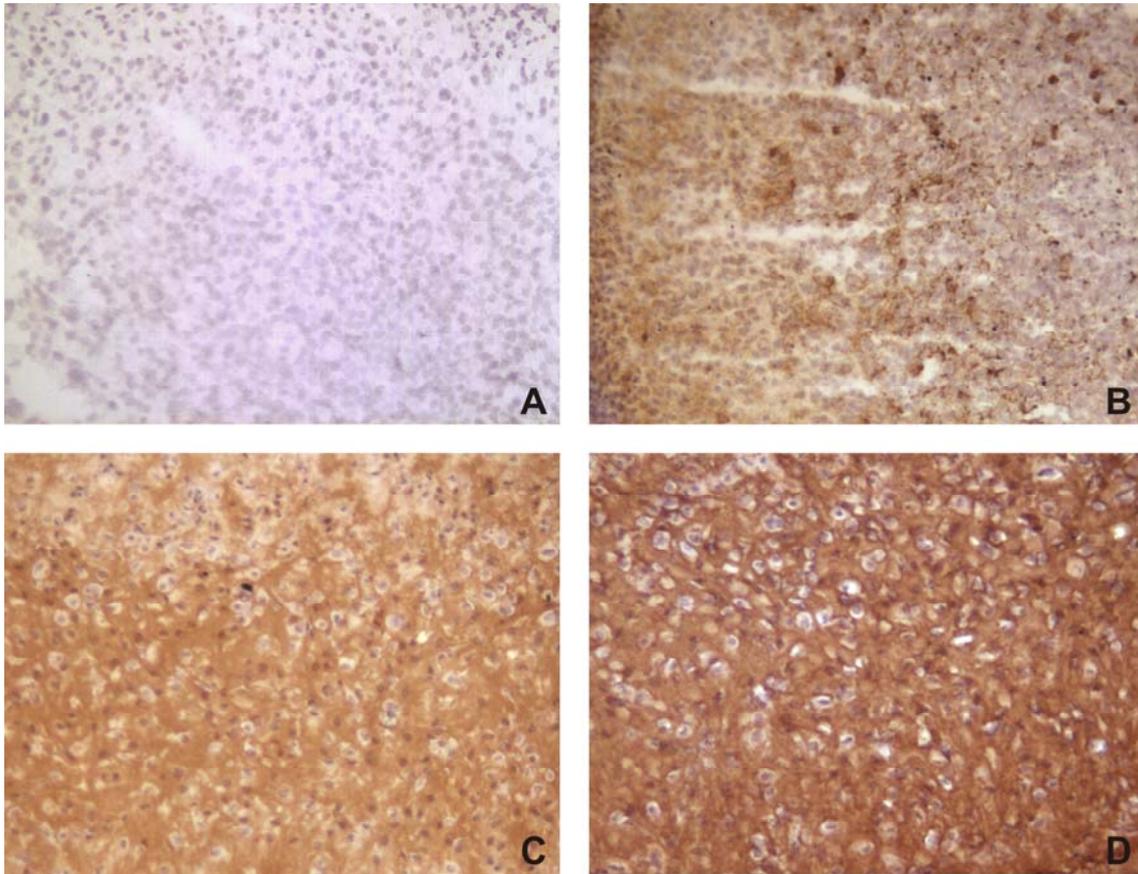
#### 4.3.2.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen der aufbereiteten Zellpellets für Kollagen Typ II wurden nach 7, 14 und 21tägiger Inkubation in einem chondrogenen Differenzierungsmedium durchgeführt. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung wurde anschließend am Mikroskop semiquantitativ erfasst. Gefrierschnitte von Zellpellets nach Abschluss der Redifferenzierung imponierten ausnahmslos durch eine stark positive Reaktion. Proben, die nur 7 Tage im chondrogenen Differenzierungsmedium kultiviert worden waren wiesen dagegen keine oder nur eine schwache Reaktion auf (vgl. Tab. 4.3 und Abb. 4.3).

<b>Immunhistochemie für Kollagen Typ II</b>						
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Probe 1</b>	<b>Probe 2</b>	<b>Probe 3</b>	<b>Probe 4</b>	<b>Probe 5</b>	<b>Probe 6</b>
7 Tage	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-
14 Tage	+	+/-	+	+	+	+
21 Tage	++	++	++	++	++	++
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Probe 7</b>	<b>Probe 8</b>	<b>Probe 9</b>	<b>Probe 10</b>	<b>Probe 11</b>	<b>Probe 12</b>
7 Tage	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
14 Tage	+/-	+	+	+	+	+
21 Tage	++	++	++	++	++	++

**Tab. 4.3: Immunhistochemie für Kollagen Typ II**

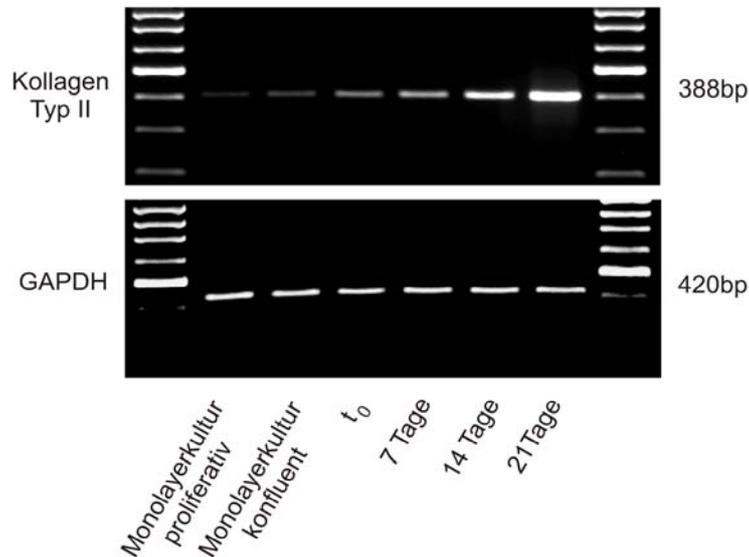
Auswertung der Immunhistochemie für Kollagen Typ II. - negative Reaktion; +/- vereinzelte bis mäßige Reaktion; + positive Reaktion; ++ stark positive Reaktion.



**Abb. 4.3: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ II an Gefrierschnitten von Zellpellets**

Repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Darstellung von Kollagen Typ II an Gefrierschnitten von Zellpellets nach 24stündiger (A; negative Reaktion, -), 7tägiger (B; vereinzelte bis mäßige Reaktion, +/-), 14tägiger (C; positive Reaktion, +) und 21tägiger (D; stark positive Reaktion, ++) Reaktivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium );Vergrößerung jeweils 200fach.

#### 4.3.2.2 PCR



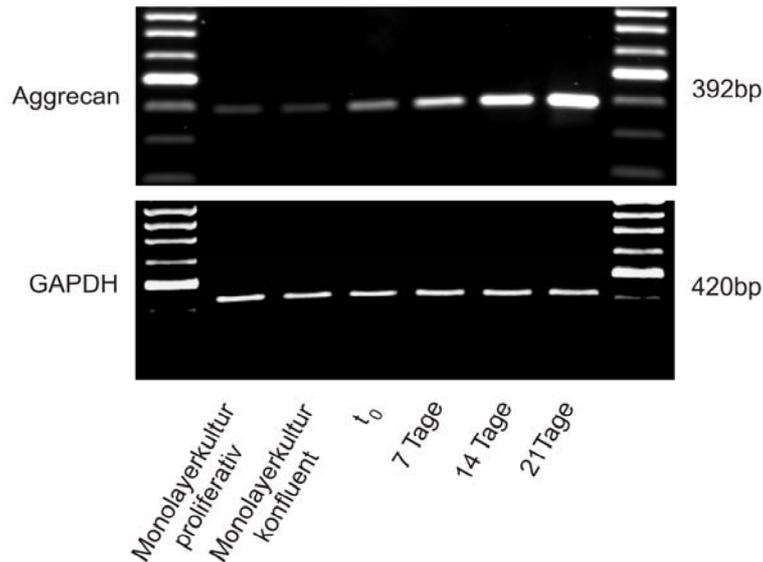
**Abb. 4.4: Agarose-Gelelektrophorese – Kollagen Typ II und GAPDH**

Expression von Kollagen Typ II während der Amplifikation der isolierten Chondrozyten in Monolayerkultur und anschließender Redifferenzierung in Pelletkultur. Sukzessive Zunahme der Expression von Kollagen Typ II im Zeitverlauf bei konstanter GAPDH-Expression. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

Für Kollagen Typ II-mRNA war in der proliferierenden Monolayerkultur eine kaum sichtbare, nach Erreichen der Konfluenz eine schwache Bande feststellbar. Während der 21tägigen Rekultivierung der expandierten Chondrozyten kam es zu einer ausgeprägten Zunahme seiner Genexpression mit Maximum bei Abschluss der Redifferenzierung nach 21 Tagen (vgl. Abb. 4.4).

#### 4.3.3 Aggrecan

Die Expression des wichtigen knorpelspezifischen Proteoglycans Aggrecan wurde an 2 Zeitpunkten während der Expansion der Zellen in Monolayerkultur sowie an 4 definierten Zeitpunkten der Rekultivierung (Pelletkultur) untersucht. Während die Aggrecan-cDNA in Chondrozyten der Monolayerkultur nur äußerst schwach nachgewiesen werden konnte, zeigte sich im Laufe der Redifferenzierung eine kontinuierliche Zunahme seiner Expression mit einem Maximum nach 21 Tagen (vgl. Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Agarose-Gelelektrophorese – Aggrecan und GAPDH**

Expression von Aggrecan während der Amplifikation der isolierten Chondrozyten in Monolayer-kultur und anschließender Redifferenzierung in Pelletkultur. Sukzessive Zunahme der Aggrecan-mRNA im Zeitverlauf bei konstanter GAPDH-Expression. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

#### 4.3.4 Darstellung der sulfatierten Glykosaminoglykane mittels Alzian-Blau

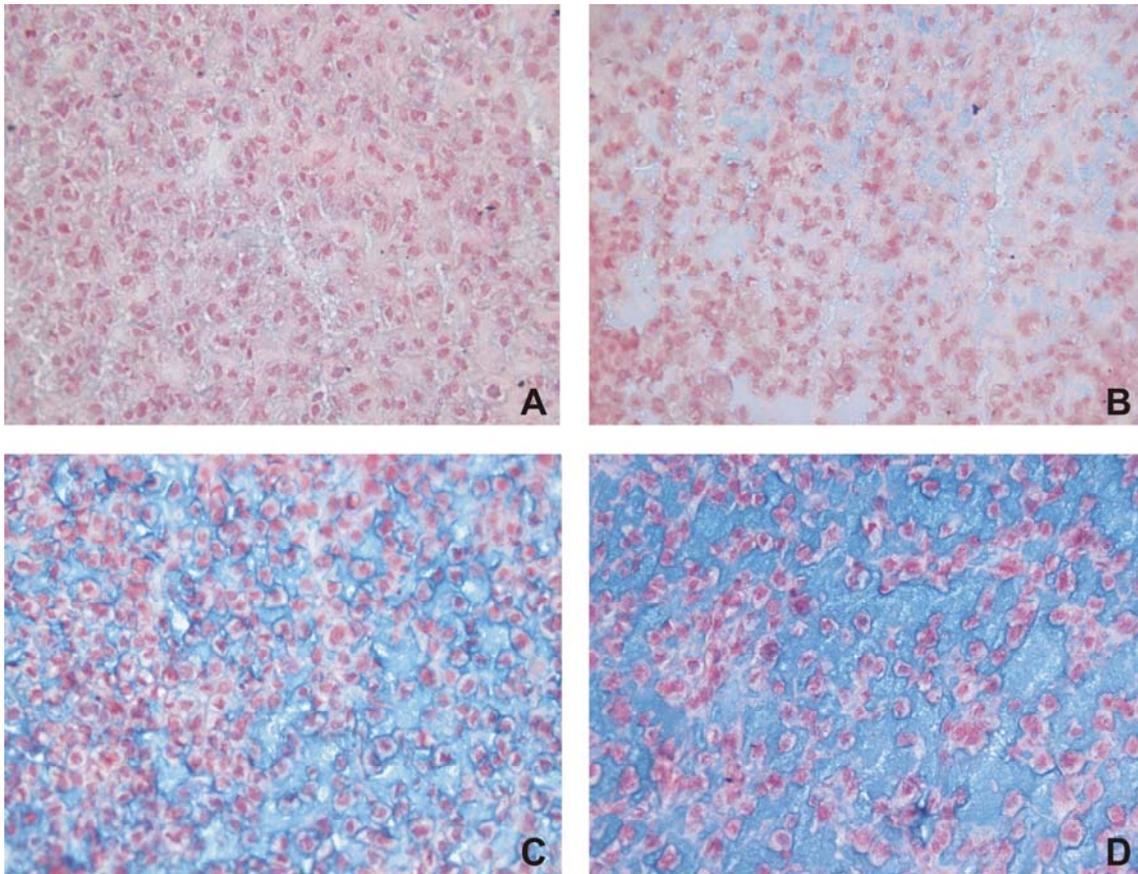
Gefrierschnitte von Zellpellets nach 7, 14 und 21tägiger Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium wurden mit Alzian-Blau gefärbt. Die mikroskopische Auswertung ergab für alle untersuchten Proben eine deutliche Zunahme der Blaufärbung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Während bei Zellpellets am Versuchstag 7 keine Anfärbung nachgewiesen werden konnte, zeigten Gefrierschnitte am Ende der Redifferenzierung nach 21 Tagen stets eine stark positive Reaktion (vgl. Tab. 4.4, Abb. 4.6 und 4.7).

Zudem konnte bei den untersuchten Zellaggregaten regelhaft ein konzentrischer Aufbau aus einer dünnen äußeren Randzone und einer homogenen inneren Zone beobachtet werden. In der äußeren Zone fand sich eine, im Vergleich zur inneren Zone schwächere Anfärbbarkeit mit Alzian (vgl. Abb. 4.7).

<b>Auswertung der Alzian-Blau Färbung</b>						
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Probe 1</b>	<b>Probe 2</b>	<b>Probe 3</b>	<b>Probe 4</b>	<b>Probe 5</b>	<b>Probe 6</b>
7 Tage	-	-	-	-	-	-
14 Tage	+	+/-	+	+/-	+	+/-
21 Tage	++	++	++	++	++	++
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Probe 7</b>	<b>Probe 8</b>	<b>Probe 9</b>	<b>Probe 10</b>	<b>Probe 11</b>	<b>Probe 12</b>
7 Tage	-	-	-	-	-	-
14 Tage	+	+	+/-	+	+	+/-
21 Tage	++	++	++	++	++	++

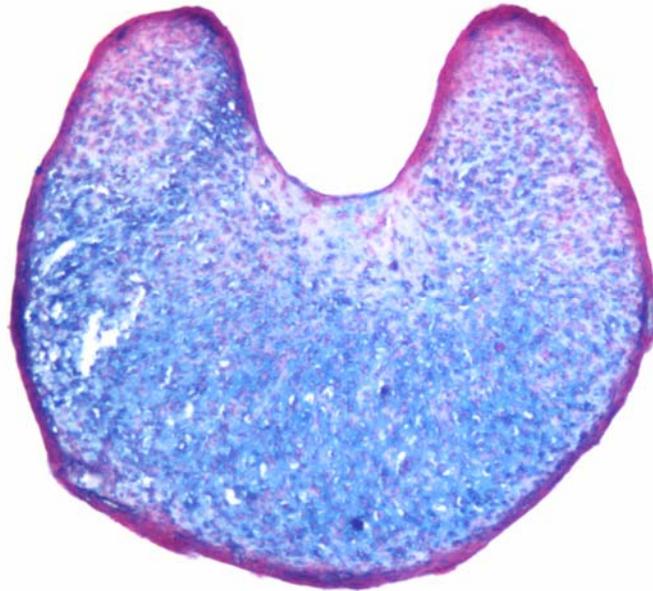
**Tab. 4.4: Auswertung der Alzian-Blau-Färbung**

Auswertungsschema: - Keine Anfärbung; +/- Vereinzelte bis mäßige Anfärbung; + Positive Reaktion; ++ Stark positive Reaktion.



**Abb. 4.6: Alzian-Blau-Färbung an Gefrierschnitten von Zellpellets während verschiedener Zeitpunkte der Redifferenzierung**

Repräsentative Abbildungen Alzian-Blau-gefärbter Gefrierschnitte von Zellpellets nach 24stündiger (A; negative Reaktion, -), 7tägiger (B; vereinzelt bis mäßige Reaktion, +/-), 14tägiger (C; positive Reaktion, +) und 21tägiger (D; stark positive Reaktion, ++) Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium );Vergrößerung jeweils 200fach.



**Abb. 4.7: Alcian-Blau-Färbung am Gefrierschnitt eines Zellpellets nach Abschluß der Redifferenzierung**

Repräsentative Abbildung eines Gefrierschnittes eines Zellpellets bei Abschluss der Redifferenzierung nach 21 Tagen; Alcian-Blau-Färbung; stark positive Reaktion (++); Vergrößerung ca. 50fach.

#### **4.4 Etablierung der PCR-Bedingungen für nNOS, iNOS und eNOS**

##### **4.4.1 Sequenzierung von DNA**

Die Inserts der verschiedenen I.M.A.G.E.-Klone wurden mit der *Dye Terminator Cycle Sequencing*-Methode, unter Verwendung geeigneter Primer ansequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit den entsprechenden Referenzsequenzen in der Referenzsequenz-Datenbank (RefSeq) des *US-National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen.

##### **4.4.1.1 Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998L13612***

Die Basen 1 bis 743 der ermittelten Sequenz waren identisch mit den Basen 3262 bis 4004 der NCBI Referenz-mRNA-Sequenz *NM\_000620* [80, 111, 112] (vgl. Abb. 4.9). Bei *NM\_000620* handelt es sich um die mRNA-Referenzsequenz der humanen neuronalen NOS.

```

1 ccaaaaatca tcaggcgatg ggcccgacct cagagacaac tttgagagtg ctggaccctc
61 ggccaatgtg aggttctcag tttttggcct cggctcacga gcataccctc acttttgcg
121 cttcggacac gctgtggaca ccctcctgga agaactggga ggggagagga tcctgaagat
181 gagggaaagg gatgagctct gtgggcagga agaggctttc aggacctggg ccaagaaggt
241 cttcaaggca gcctgtgatg tcttctgtgt gggagatgat gtcaacattg aaaaggccaa
301 caattccctc atcagcaatg atcgcagctg gaagagaaac aagttccgcc tcacctttgt
361 ggccgaagct ccagaactca cacaaggtct atccaatgtc cacaaaaagc gagtctcagc
421 tgcccggctc cttagccgctc aaaacctcca qaqcctaaa tccagtcggt caactatctt
481 cgtgcgtctc cacaccaacg ggagccagga gctgcagtac cagcctgggg accacctggg
541 tgtcttccct ggcaaccacg aggacctcgt gaatgccctg atcgagcggc tggaggacgc
601 gccgcctgtc aaccagatgg tgaagtgga actgctggag gagcggaaac cggttttag
661 tgcatcag taactggacag acgaqctccq cctcccqccc tgcaccatct tccaggcctt
721 caagtacta cctggacatca cca

```

**Abb. 4.8: Ergebnis der Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998L13612***

Ausschnitt der Nukleotidsequenz des Inserts von Klon *IMAGp998L13612* Basierend auf diesen Daten wurde folgendes nNOS-Primerpaar gewählt: nNOSforward entspricht Basen 254 – 278, nNOSreverse ist komplementär zu den Basen 650 – 675 (jeweils fett gedruckt).

#### 4.4.1.2 Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998E09512*

Der Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung mit der entsprechenden NCBI-mRNA-Referenzsequenz zeigte eine Übereinstimmung der ermittelten Daten mit den Basen 2697 bis 3472 von *NM\_000625*, der Referenzsequenz der humanen induzierbaren NOS [42, 43, 125] (vgl. Abb. 4.10).

```

1 accacacccc caaccagct gctgctccaa aagctggccc aggtggccac agaagagcct
61 gagagacaga ggctggaggc cctgtgccag ccctcagagt acagcaagtg gaagttcacc
121 aacagcccca cattcctgga ggtgctagag gagttcccgt ccctgcgggt gtctgctggc
181 ttctgtcttt ccagctccc cattctgaag ccaggttct actccatcag ctccccccgg
241 gatcacacgc ccacggagat ccacctgact gtggccgtgg tcacctacca cacccgagat
301 ggccagggtc ccctgcacca cgggctctgc agcacatggc tcaacagcct gaagcccaaa
361 gaccagtgct cctgctttgt gcggaatgcc agcggcttcc acctccccga ggatccctcc
421 catccttgca tctcatcgg gcctggcaca ggcacgcgc ccttccgag tttctggcag
481 caacggctcc atgactcca gcacaaggga gtgcggggag gccgcatgac cttggtgttt
541 gggtgccgcc gccagatga ggaccacatc taccaggagg agatgctgga gatggcccag
601 aaggggggtg tgcacgcggt gcacacagcc tattcccgcc tgctggcaa gcccaaggtc
661 tatgttcagg acatcctgct gcagcagctg gccagcagg tgctccgtgt gctccacaag
721 gagccaggcc acctctatgt ttgccccgat gtgcgcatgg cccgggacgt ggccca

```

**Abb. 4.9: Ergebnis der Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998E09512***

Ausschnitt der Nukleotidsequenz des Inserts von Klon *IMAGp998E09512*. Basierend auf diesen Daten wurde folgendes iNOS-Primerpaar gewählt: iNOSforward entspricht Basen 320 – 339, iNOSreverse ist komplementär zu den Basen 700 – 720 (jeweils fett gedruckt).

#### 4.4.1.3 Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998I126077*

Der Abgleich der, bei der Sequenzierung des Klons *IMAGp998I126077* gewonnenen Daten mit der Datenbank des NCBI erbrachte eine Übereinstimmung mit den Basen 2196 bis 2762 von *NM\_000603* (vgl. Abb. 4.11), der Referenz-mRNA-Sequenz der humanen endothelialen NOS [103, 134, 135].

```

1  cccaaacgga gctggaagcg ccagaggtac cggctgagcg cccaggccga gggcctgcag
61  ttgctgccag gtctgatcca cgtgcacagg cgggaagatg tccaggctac aatccgctca
121 gtggaaaacc tgcaaagcag caagtccacg agggccacca tcttgggtcg cctggacacc
181 ggaggccagg aggggctgca gtaccagccg ggggaccaca taggtgtctg cccgcccac
241 cggcccggcc ttgtggaggc gctgctgagc cgcgtggagg acccgccggc gccactgag
301 cccgtggcag tagagcagct ggagaagggc agccctgggt gccctcccc cggctgggtg
361 cgggaccccc ggctgcccc gtgcacgctg cgcagggctc tcaccttctt cctggacatc
421 acctccccac ccagccctca gctcttgagg ctgctcagca ccttggcaga agagcccagg
481 gaacagcagg agctggaggc cctcagccag gatccccgac gctacgagga gtggaagtgg
541 ttccgctgcc ccacgctgct ggaggtg

```

**Abb. 4.10: Ergebnis der Sequenzanalyse des Inserts von Klon *IMAGp998I126077***

Ausschnitt der Nukleotidsequenz des Inserts von Klon *IMAGp998I126077*. Basierend auf diesen Daten wurde folgendes eNOS-Primerpaar gewählt: eNOSforward entspricht Basen 80 – 99, eNOSreverse ist komplementär zu den Basen 428 – 449 (jeweils fett gedruckt).

#### 4.4.1.4 Kontroll-Sequenzierung von PCR-Amplifikaten

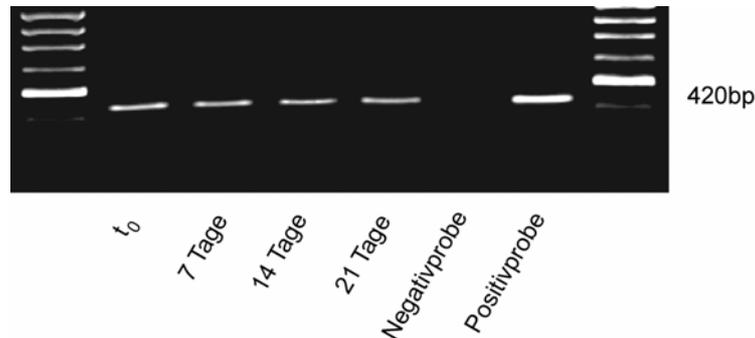
Die, beim Nachweis der verschiedenen NOS-Isoformen (vgl. Kap. 4.5.3) erhaltenen RT-PCR-Amplifikate der erwarteten Größe wurden zur Überprüfung sequenziert. Die Sequenzierung ergab in allen Fällen, dass die gesuchten Genabschnitte mit den, in der RT-PCR eingesetzten Primern amplifiziert wurden.

### 4.5 Spezifische RT-PCR

#### 4.5.1 Qualitätskontrolle mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

Als positive Expressionskontrolle bzw. interner Standard wurde die revers transkribierte cDNA von Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), einem *housekeeping*-Gen, in den RT-Reaktionsansätzen aller Experimente amplifiziert. Die GAPDH-mRNA-Expression war jeweils gleich stark.

Abbildung 4.11 zeigt beispielhaft die GAPDH-mRNA-Expression expandierter Chondrozyten (Spender Nr. 3) an 4 definierten Zeitpunkten der Rekultivierung.



**Abb.: 4.11: Agarose-Gelelektrophorese - GAPDH**

Genexpression des housekeeping-Gens GAPDH während der Reaktivierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten in Form von high-density-pellets. Als Positivprobe für GAPDH diente mRNA der Zelllinie C28I<sub>2</sub>. Bei der Negativprobe wurde dem PCR-Ansatz anstatt eines DNA-Templates das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. Konstante Expression der GAPDH-mRNA im Zeitverlauf der Reaktivierung. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

#### 4.5.2 Negativkontrollen

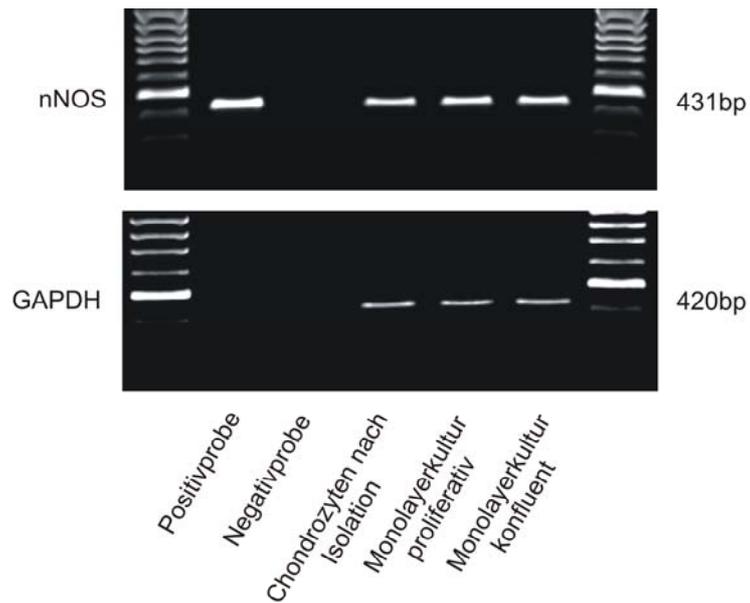
In allen Experimenten wurde eine Negativprobe eingesetzt. Anstatt eines DNA-Templates wurde dem PCR-Ansatz hierbei das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. Bei der anschließenden Auftrennung dieser Proben im Agarosegel konnten keine Banden nachgewiesen werden.

#### 4.5.3 Genexpression der NOS-Isoformen

Untersuchungen zur Genexpression der NOS-Isoformen wurden an RNA aus Chondrozyten von insgesamt 12 verschiedenen Spendern durchgeführt. Mittels RT-PCR wurde die Expression isoformenspezifischer mRNA an folgenden Zeitpunkten analysiert: Chondrozyten nach enzymatischer Isolierung, proliferative Monolayerkultur, konfluente Monolayerkultur sowie an den Versuchstagen 0, 7, 14 und 21 (vgl. Abb. 4.12a bis 4.15b) während der Reaktivierung der expandierten Zellen in Form von high-density-pellets in einem chondrogenen Differenzierungsmedium.

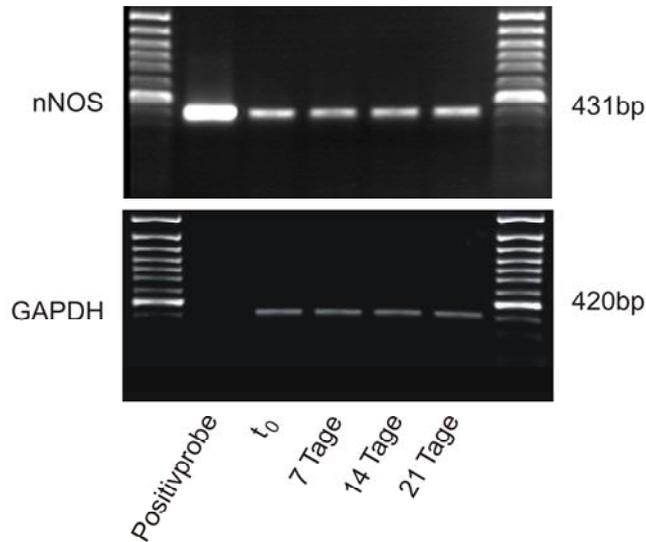
#### 4.5.3.1 nNOS

Das nNOS-Gen wurde von den Chondrozyten an allen 7 definierten Untersuchungszeitpunkten exprimiert. Unterschiede in der Expressionsstärke konnten nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 4.12a und 4.12b).



**Abb. 4.12a: Agarose-Gelelektrophorese – nNOS und GAPDH**

Genexpression der nNOS humaner artikulärer Chondrozyten nach Isolation sowie während der Expansion in Monolayerkultur. Als Positivprobe diente DNA des I.M.A.G.E.-Klons IMAGp998L13612. Bei der Negativprobe wurde dem PCR-Ansatz anstatt eines DNA-Templates das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

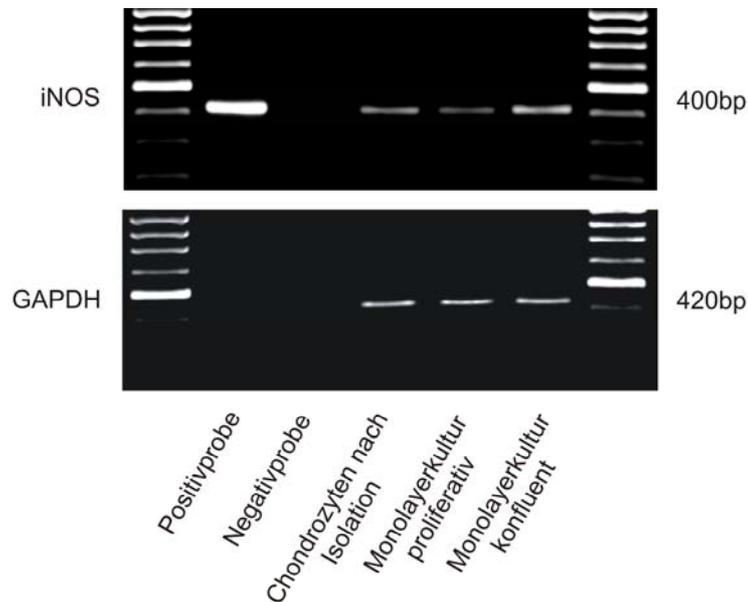


**Abb. 4.12b: Agarose-Gelelektrophorese – nNOS und GAPDH**

Genexpression der nNOS in expandierten Chondrozyten während deren Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium. Als Positivprobe diente DNA des I.M.A.G.E.-Klons IMAGp998L13612. Konstante Expression von nNOS und GAPDH im Zeitverlauf der Redifferenzierung. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

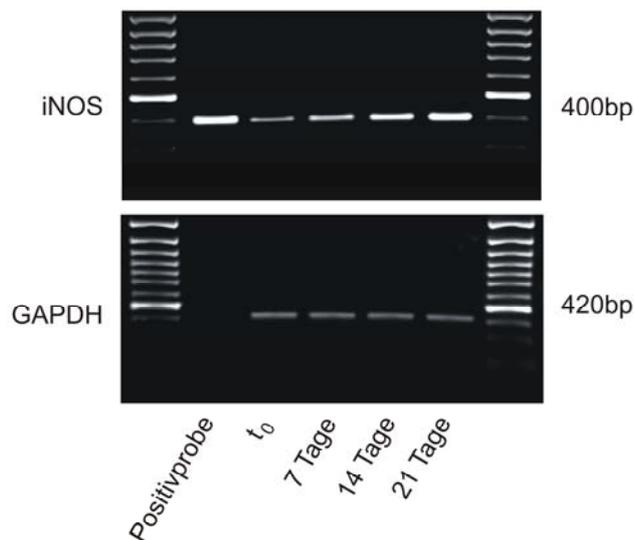
#### 4.5.3.2 iNOS

Für die iNOS-mRNA konnten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten quantitative Expressionsunterschiede detektiert werden. Nach Isolation der Knorpelzellen aus der sie umgebenden Extrazellulärmatrix war eine schwache Expression der iNOS nachweisbar. Bei proliferierenden Zellen der Monolayerkultur fand sich eine geringere Bandenstärke als nach Erreichen der Konfluenz. Während der anschließenden 21tägigen Rekultivierung der expandierten Chondrozyten in Form dreidimensionaler Zellaggregate konnte eine deutliche Zunahme der Bandenstärke beobachtet werden. Ausgehend von einer schwachen Bande am Zeitpunkt  $t_0$  (Versuchstag 0) zeigte sich eine sukzessive Zunahme der iNOS-Genexpression im Zeitverlauf der Kultivierung. Die stärksten Banden ergaben sich regelmäßig für den Versuchstag 21, am Ende der Redifferenzierung (vgl. Abb. 4.13a, 4.13b und 4.14).



**Abb. 4.13a: Agarose-Gelelektrophorese – iNOS und GAPDH**

Genexpression der iNOS humaner artikulärer Chondrozyten nach Isolation sowie während der Expansion in Monolayerkultur. Als Positivprobe diente DNA des I.M.A.G.E.-Klons IMAGp998E09512. Bei der Negativprobe wurde dem PCR-Ansatz anstatt eines DNA-Templates das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.



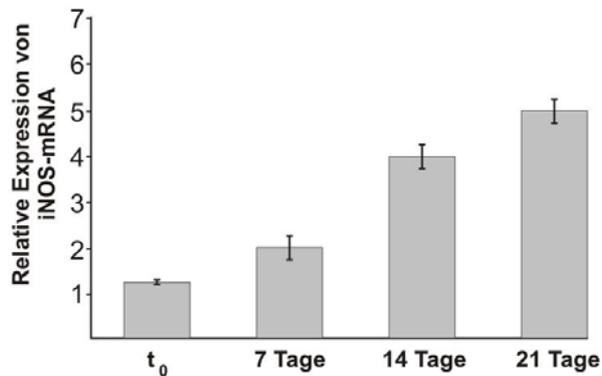
**Abb. 4.13b: Agarose-Gelelektrophorese – iNOS und GAPDH**

Genexpression der iNOS in expandierten Chondrozyten während deren Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium. Als Positivprobe diente DNA des I.M.A.G.E.-Klons IMAGp998E09512 (iNOS). Sukzessive Zunahme der iNOS Expression im Zeitverlauf der

## Ergebnisse

---

Redifferenzierung bei konstanter Expression von GAPDH. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

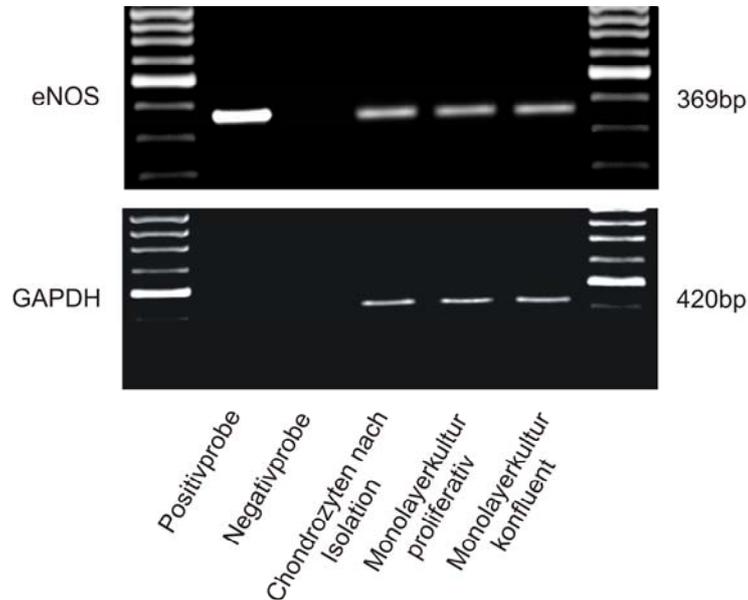


**Abb. 4.14: Relative Expression der iNOS-mRNA**

In Monolayerkultur expandierte Chondrozyten wurden als Zellpellets in einem chondrogenen Differenzierungsmedium redifferenziert. Die Expression der iNOS wurde mittels RT-PCR und Densitometrie semiquantitativ erfasst. Die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte für iNOS wurde mit der für GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte für n=4 +/- Standardabweichung. Es zeigt sich eine sukzessive Zunahme der relativen Expression der iNOS-mRNA im Zeitverlauf der Redifferenzierung.

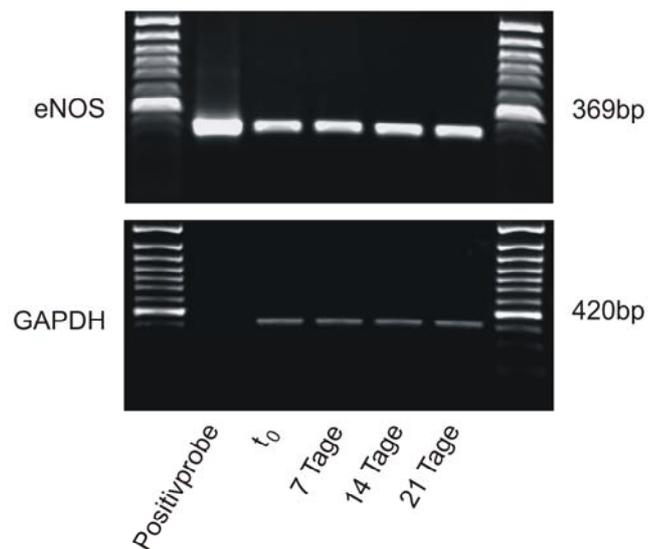
### 4.5.3.3 eNOS

Das eNOS-Gen wurde von expandierten Chondrozyten nach enzymatischer Isolation sowie während der Gesamtdauer der Kultivierung in Monolayer und als Zellaggregate exprimiert. Unterschiede in der Expressionsstärke dieses Gens wurden nicht registriert (vgl. Abb. 4.15a und 4.15b).



**Abb. 4.15a: Agarose-Gelelektrophorese – eNOS und GAPDH**

Genexpression der eNOS humaner artikulärer Chondrozyten nach Isolation sowie während der Expansion in Monolayerkultur. Als Positivprobe diente DNA aus den I.M.A.G.E.-Klonen IMAGp998I126077. Bei der Negativprobe wurde dem PCR-Ansatz anstatt eines DNA-Templates das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. Keine Unterschiede in der Intensität der eNOS-mRNA-Expression. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.



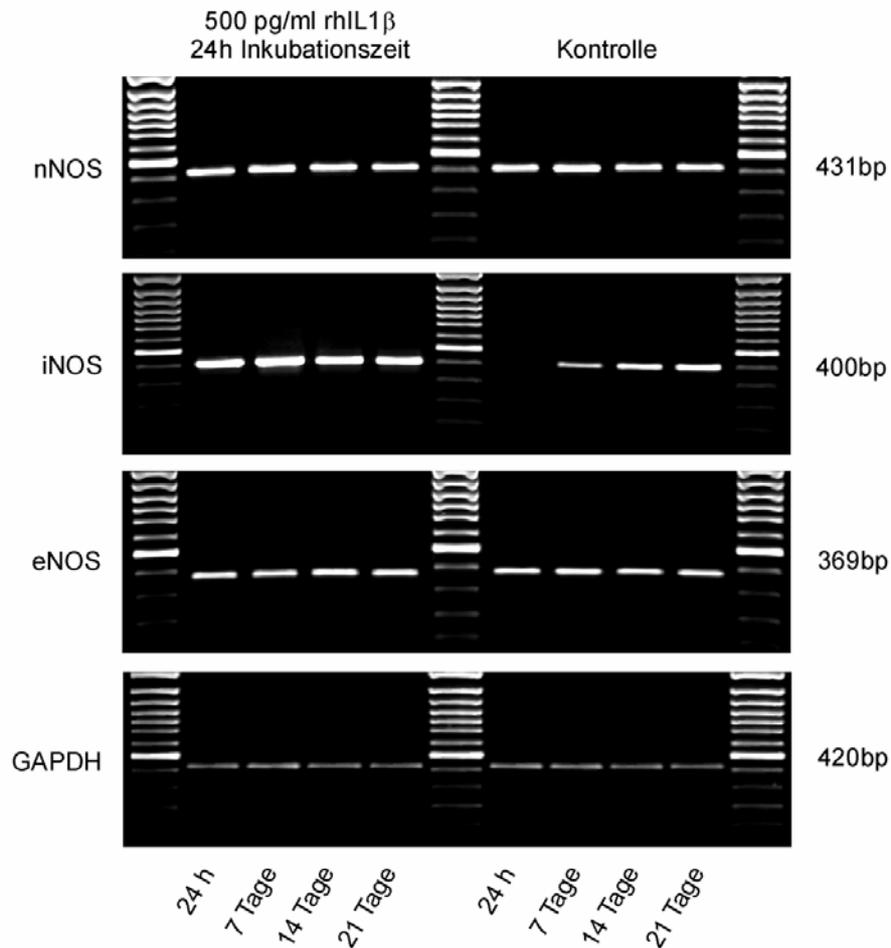
**Abb. 4.15b: Agarose-Gelelektrophorese – eNOS und GAPDH**

Genexpression der eNOS in expandierten Chondrozyten während deren Reaktivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium. Als Positivprobe diente DNA des I.M.A.G.E.-Klons

IMAGp998I126077 (eNOS). Konstante Expression von eNOS und GAPDH im Zeitverlauf der Redifferenzierung. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

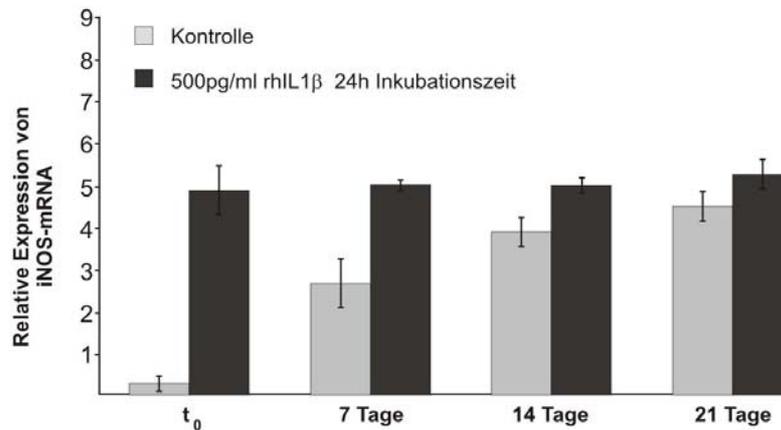
### **4.5.3.4 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf der Expression der NOS-Isoformen**

In mehreren Versuchsreihen wurde der Einfluss des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  auf die Expression der verschiedenen NOS-Isoformen während der Redifferenzierung untersucht. An den Versuchstagen 0, 6, 13 und 20 wurde bei allen Pelletkulturen ein Mediumwechsel durchgeführt. Dem chondrogenen Differenzierungsmedium der Testgruppe wurde zusätzlich 500pg/ml rhIL-1 $\beta$  zugesetzt. Für die Kontrollgruppe wurde Standard-Differenzierungsmedium ohne rhIL-1 $\beta$ -Zusatz verwendet. Die Pellets wurden anschließend für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA extrahiert und die Expression der NOS-Isoformen in der Testgruppe mit der Kontrolle verglichen. Für die nNOS-mRNA ergaben sich hierbei keine Unterschiede. In der Gruppe der mit rhIL-1 $\beta$  stimulierten Zellpellets ließ sich jedoch eine Hochregulation der iNOS-Transkripte nachweisen. Für alle Untersuchungszeitpunkte fanden sich in der Testgruppe deutlich stärkere iNOS-Banden als in der Kontrolle. Die eNOS-Expression der stimulierten Chondrozyten war leicht geringer als die der unbehandelten Zellen.



**Abb. 4.16: Agarose-Gelelektrophorese – NOS-Isoformen und GAPDH**

Einfluss von rhIL-1 $\beta$  auf die Expression der 3 NOS-Isoformen während der Redifferenzierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten. . Zur densitometrischen Auswertung der iNOS-mRNA-Expression vgl. Abb. 4.18. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen. Der Versuch wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.



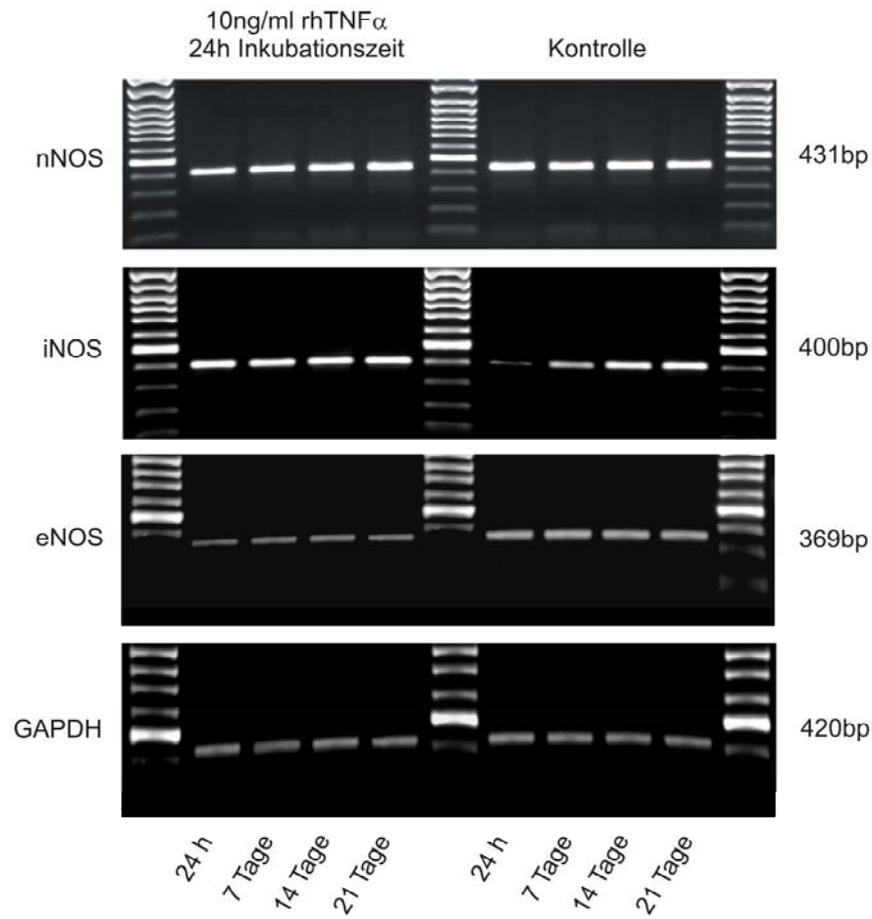
**Abb. 4.17: Relative Expression der iNOS-mRNA**

Chondrozyten-Pellets wurden mit 500pg/ml rhIL1 $\beta$  inkubiert und die Expression der iNOS mittels RT-PCR und Densitometrie semiquantitativ erfasst. Als Kontrolle dienten Zellpellets des gleichen Spenders, die unter Standardbedingungen redifferenziert wurden. Die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte für iNOS wurde mit der für GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte für n=4 +/- Standardabweichung.

#### 4.5.3.5 Einfluss von TNF $\alpha$ auf die Expression der NOS-Isoformen

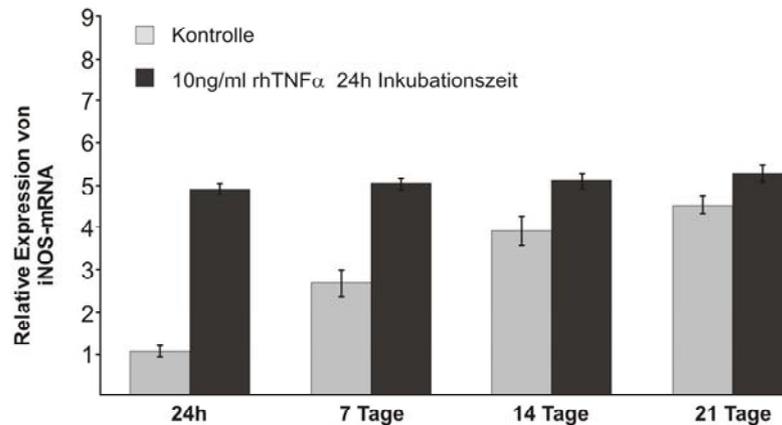
Analog der Stimulation mit rhIL-1 $\beta$  wurden Chondrozyten-Pellets mit 10ng/ml rhTNF $\alpha$  inkubiert und die Expression der NOS-Isoformen mittels RT-PCR-Analysen semiquantitativ erfasst.

Das nNOS-Gen zeigte im Vergleich zu Kontrollen keine quantitativen Expressionsunterschiede. Für die iNOS waren in der Testgruppe an allen vier Untersuchungszeitpunkten deutlich stärkere Banden nachweisbar als bei unstimulierten Zellen. Chondrozyten unter dem Einfluss von rhTNF $\alpha$  imponierten durch eine etwas geringere eNOS-Genexpression.



**Abb. 4.18: Agarose-Gelelektrophorese – NOS-Isoformen und GAPDH**

Einfluss von rhTNF $\alpha$  auf die Expression der 3 NOS-Isoformen während der Redifferenzierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen. Zur densitometrischen Auswertung der iNOS-mRNA-Expression vgl. Abb. 4.20. Der Versuch wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.

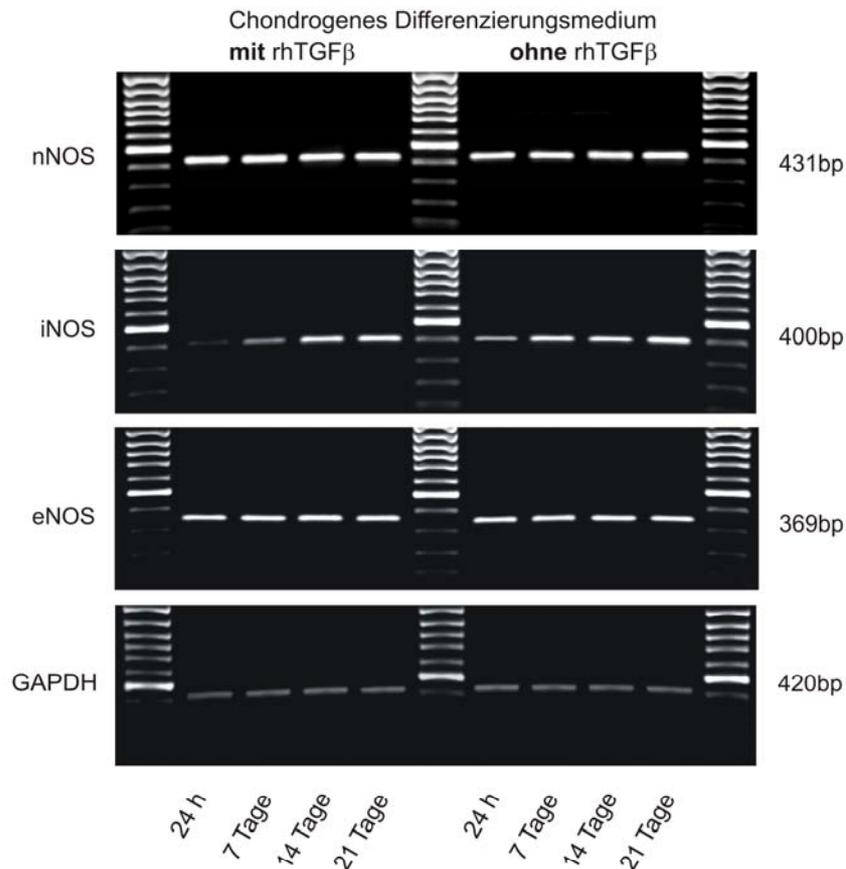


**Abb. 4.19: Relative Expression der iNOS-mRNA**

Chondrozyten-Pellets wurden mit 10ng/ml rhTNF $\alpha$  inkubiert und die Expression der iNOS mittels RT-PCR und Densitometrie semiquantitativ erfasst. Als Kontrolle dienten Zellpellets des gleichen Spenders, die unter Standardbedingungen redifferenziert wurden. Die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte für iNOS wurde mit der für GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte für n=4 +/- Standardabweichung.

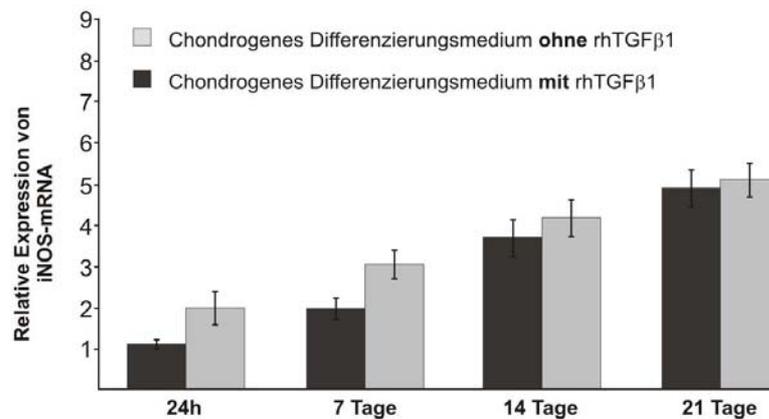
#### 4.5.3.6 Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die Expression der NOS-Isoformen

Um den Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die Expression der NOS-Isoformen zu überprüfen wurden Aggregate expandierter Zellen des selben Spenders in einem chondrogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Einer Kontrollgruppe wurde wie gewohnt bei jedem Mediumwechsel 1 $\mu$ l rhTGF $\beta$ 1 pro ml Medium zupipettiert, in der Testgruppe wurde dieser Zusatz nicht verwendet. Die ohne rhTGF $\beta$ 1 kultivierten Pellets der Testgruppe zeigten zu allen Zeitpunkten eine sichtbar stärkere Bande für die iNOS-RT-PCR-Amplifikate. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.



**Abb. 4.20: Agarose-Gelelektrophorese – NOS-Isoformen und GAPDH**

Einfluss von rhTGF $\beta$  auf die Expression von iNOS; im unteren Bildabschnitt ist das entsprechende Ergebnis der GAPDH-Qualitätskontrolle dargestellt. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen. Zur densitometrischen Auswertung der iNOS-mRNA-Expression vgl. Abb. 4.22. Der Versuch wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.

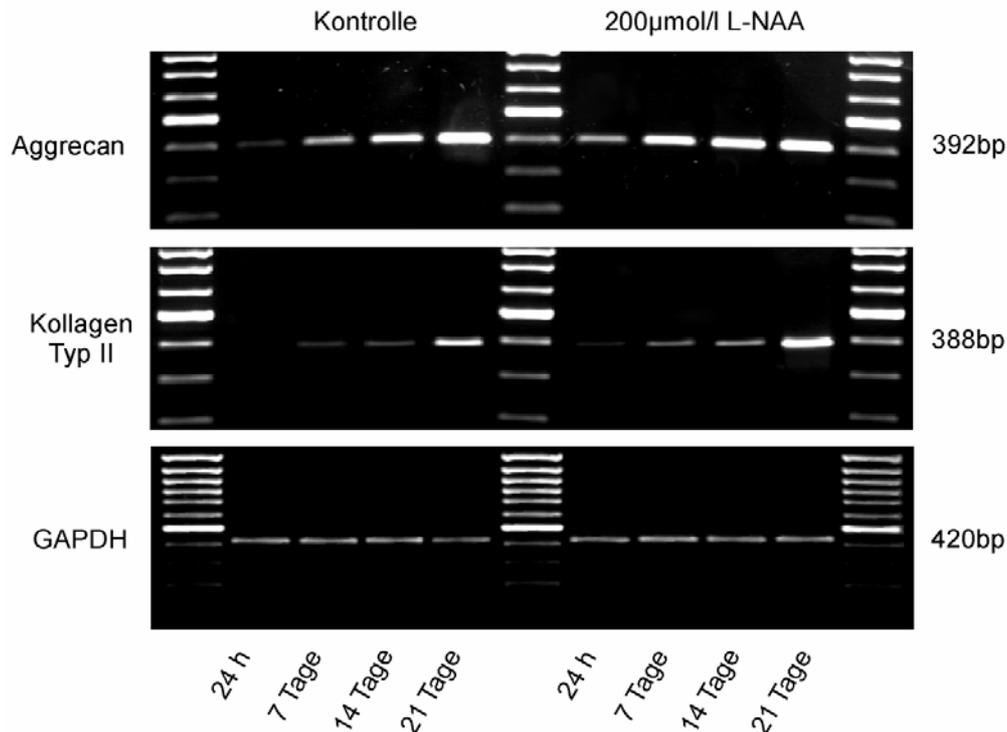


**Abb. 4.21: Relative Expression der iNOS-mRNA**

Chondrozyten-Pellets wurden in einem chondrogenen Differenzierungsmedium ohne Zusatz von rhTGFβ1 inkubiert und die Expression der iNOS mittels RT-PCR und Densitometrie semiquantitativ erfasst. Als Kontrolle dienten Zellpellets des gleichen Spenders, die unter Standardbedingungen in einem Differenzierungsmedium mit Zusatz von 1µl rhTGFβ1 pro ml Medium redifferenziert wurden. Die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte für iNOS wurde mit der für GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte für n=4 +/- Standardabweichung.

#### **4.5.4 Auswirkungen der Inhibition der NOS auf die Genexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II während der Redifferenzierung**

In mehreren Experimenten wurde der Einfluss des NOS-Inhibitors L-NAA auf die Genexpression der wichtigsten knorpelspezifischen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan untersucht. Hierbei wurden Zellpellets, die in einem chondrogenen Differenzierungsmedium kultiviert wurden, das 200µmol/l L-NAA enthielt mit einer Kontrolle verglichen für die Standard-Differenzierungsmedium verwendet wurde. Bis auf den Zusatz von L-NAA waren die Kultur-Bedingungen beider Gruppen identisch. Die Versuchsreihe mit Zusatz des NOS-Inhibitors zeigte im Vergleich zur Kontrolle quantitative Expressionsunterschiede. Sowohl Aggrecan als auch Kollagen Typ II wurden stärker bzw. zu einem früheren Zeitpunkt der Redifferenzierung exprimiert.



**Abb. 4.22: Agarose-Gelelektrophorese – Aggrecan und Kollagen Typ II/GAPDH**

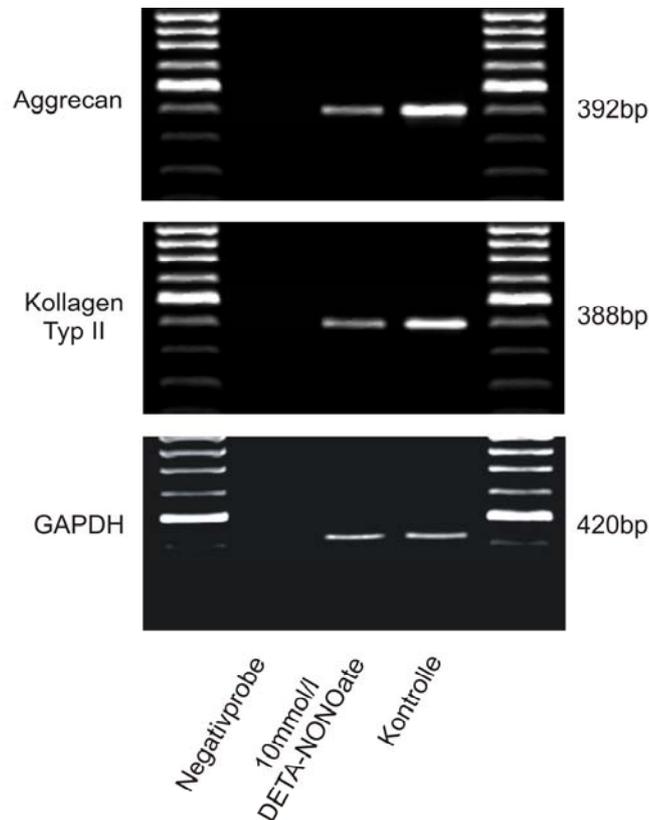
Aggrecan- und Kollagen Typ II-Genexpression während der Redifferenzierung unter Einfluss von L-NAA im Vergleich zur Kontrolle. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

#### 4.5.5 Genexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II unter Einfluss des NO-Donors DETA-NONOate

Analog zu den Experimenten mit dem NOS-Inhibitor L-NAA wurden Versuche mit dem NO-Donor DETA-NONOate durchgeführt. Dem chondrogenen Differenzierungsmedium der Zellpellets wurde hierbei DETA-NONOate in einer Konzentration von 10mmol/l zugesetzt. Die Zellaggregate wurden anschließend bei Standardbedingungen inkubiert, ein Wechsel des Mediums wurde alle 48h vorgenommen. Nach 24h, sowie nach 7, 14 und 21 Tagen wurde Gesamt-RNA isoliert und die Expression von Aggrecan und Kollagen Typ II mittels RT-PCR analysiert: Zellpellets unter der Wirkung des eingesetzten NO-Donors zeigten im Vergleich zu Kontrollen (Standarddifferenzierungsmedium ohne DETA-NONOate-Zusatz) eine deutlich geringere Expression der beiden untersuchten Matrixproteine (vgl. Abb. 4.22).

## Ergebnisse

Dieser Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.



**Abb. 4.23: Agarose-Gelelektrophorese – Aggrecan und Kollagen/GAPDH**

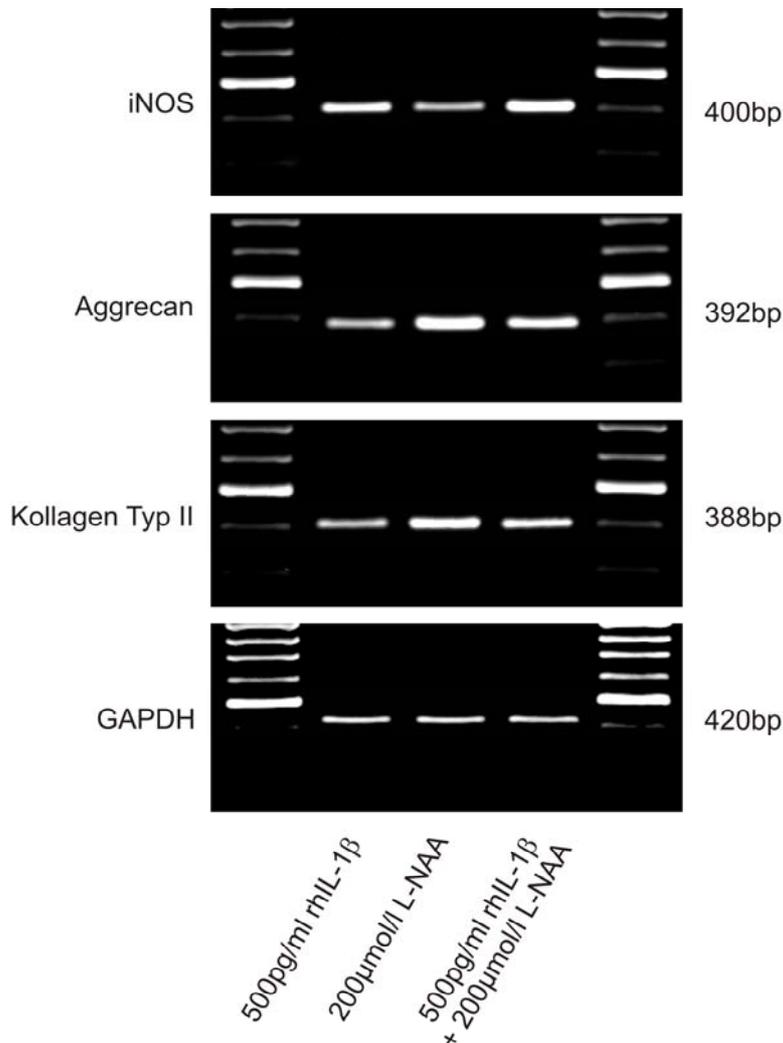
Einfluss des NO-Donors DETA-NONOate (10mmol/l) auf die Genexpression von Aggrecan und Kollagen Typ II in Zellaggregaten nach Abschluss der Redifferenzierung nach 21 Tagen. Als Kontrolle dienten Zellpellets aus Chondrozyten des gleichen Spenders, die in Standarddifferenzierungsmedium ohne DETA-NONOate-Zusatz rekultiviert wurden. Bei der Negativprobe wurde dem PCR-Ansatz anstatt eines DNA-Templates das entsprechende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen.

### 4.5.6 Einfluss der potentiell NOS-modulierenden Cytokine IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan

Zellpellets nach Abschluss der Redifferenzierung wurden für 24 Stunden entweder mit 500pg/ml rhIL-1 $\beta$ , 200 $\mu$ mol/l des NOS-Inhibitors L-NAA oder simultan mit beiden

Substanzen bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Genexpression der iNOS sowie von Kollagen Typ II und Aggrecan analysiert.

Aus der Stimulation redifferenzierter Zellpellets mit rhIL-1 $\beta$  resultierte eine starke Induktion der iNOS-mRNA. Die Expression der beiden Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan nahm im Vergleich zu Kontrollen, die nicht mit rhIL-1 $\beta$  behandelt worden waren, deutlich ab. Bei alleinigem Zusatz von 200 $\mu$ mol/l L-NAA konnte eine, im Vergleich zu Kontrollen, erhöhte Expression der beiden untersuchten Matrixproteine nachgewiesen werden. Zellpellets, die in einem Differenzierungsmedium inkubiert wurden, dem simultan sowohl 500pg/ml rhIL-1 $\beta$  als auch 200 $\mu$ mol/l des NOS-Inhibitors zugegeben wurden präsentierten für Kollagen Typ II und Aggrecan stärkere Banden als die Gruppe mit alleinigem Zusatz von rhIL-1 $\beta$ . Die Bandenstärke der Kontrollgruppe wurde jedoch nicht erreicht. Dieser Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.

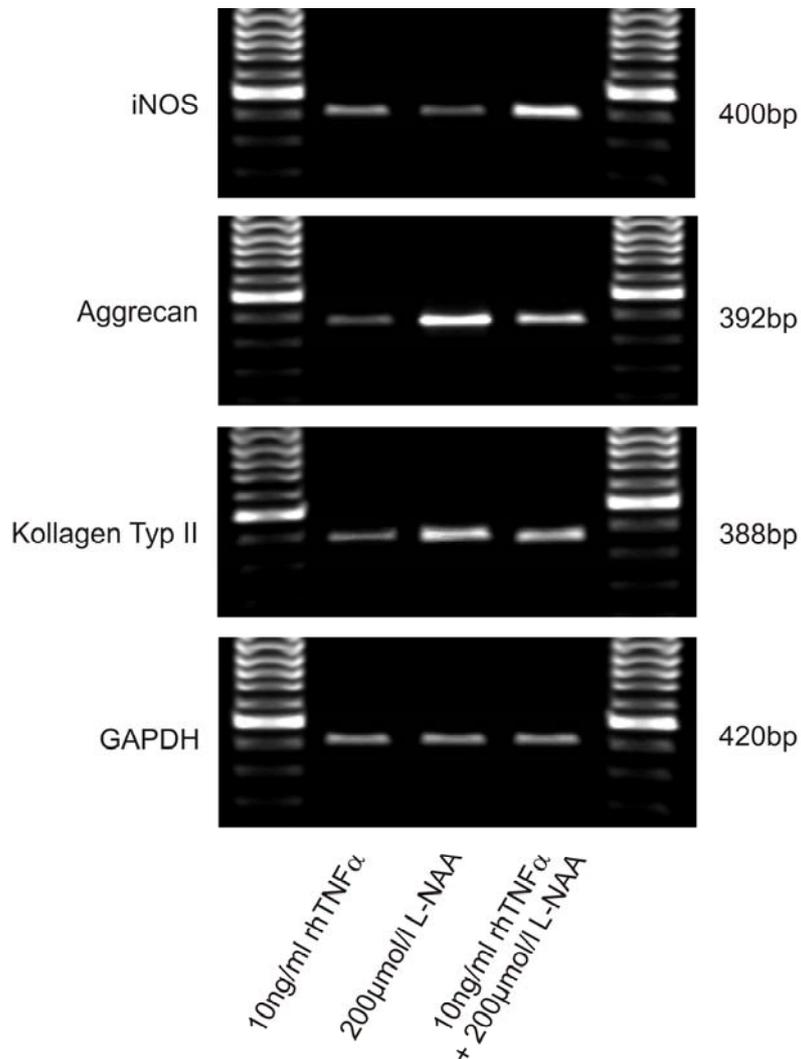


**Abb. 4.24: Agarose-Gelelektrophorese – iNOS, Aggrecan, Kollagen Typ II und GAPDH**

Zellenpellets wurden für 24 h mit rhIL-1 $\beta$  (500pg/ml), L-NAA (200 $\mu$ mol/l) und rhIL-1  $\beta$  + L-NAA inkubiert. Anschließend wurde die Expression von iNOS, Aggrecan, Kollagen Typ II und GAPDH mittels RT-PCR nachgewiesen. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen. Der Versuch wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.

In weiteren Versuchreihen analog dem oben beschriebenen Aufbau wurden anstatt 500pg/ml rhIL-1 $\beta$  10ng/ml rhTNF $\alpha$  verwendet. Die 24stündige Inkubation der Zellpellets mit rhTNF $\alpha$  führte zu einem Anstieg der iNOS-mRNA sowie zu einer, im Vergleich zu Kontrollen (Standard-Differenzierungsmedium), reduzierten Expression der Kollagen Typ II- und Aggrecan-mRNA. Aus dem alleinigen Zusatz von 200 $\mu$ mol/l

L-NAA resultierten deutlich stärkere Banden für die beiden untersuchten Matrixproteine als bei Zellpellets die in Differenzierungsmedium ohne den NOS-Inhibitor inkubiert wurden. Der simultane Einsatz von L-NAA und rhTNF $\alpha$  erbrachte sowohl für Kollagen Typ II als auch für Aggrecan in der Gelelektrophorese deutliche Banden. Die Expressionsstärke dieser beiden Matrixproteine war in dieser Gruppe deutlich höher als bei Zellpellets, die nur mit rhTNF $\alpha$  stimuliert worden waren. Die Bandenstärke der Testgruppe, der lediglich der NOS-Inhibitor zugesetzt worden war, wurde jedoch nicht erreicht.



**Abb. 4.25: Agarose-Gelelektrophorese – iNOS, Aggrecan, Kollagen Typ II und GAPDH**

Die Zellen wurden 24 h mit rhTNF $\alpha$  (10ng/ml), L-NAA (200 $\mu$ mol/l) und rhTNF $\alpha$  + L-NAA inkubiert und anschließend die Expression von iNOS, Aggrecan und Kollagen Typ II nachgewiesen. In den beiden äußersten Spuren wurde der DNA-Standard PEQGOLD 100bp DNA-Leiter Plus aufgetragen. Der Versuch wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander durchgeführt und lieferte identische Resultate.

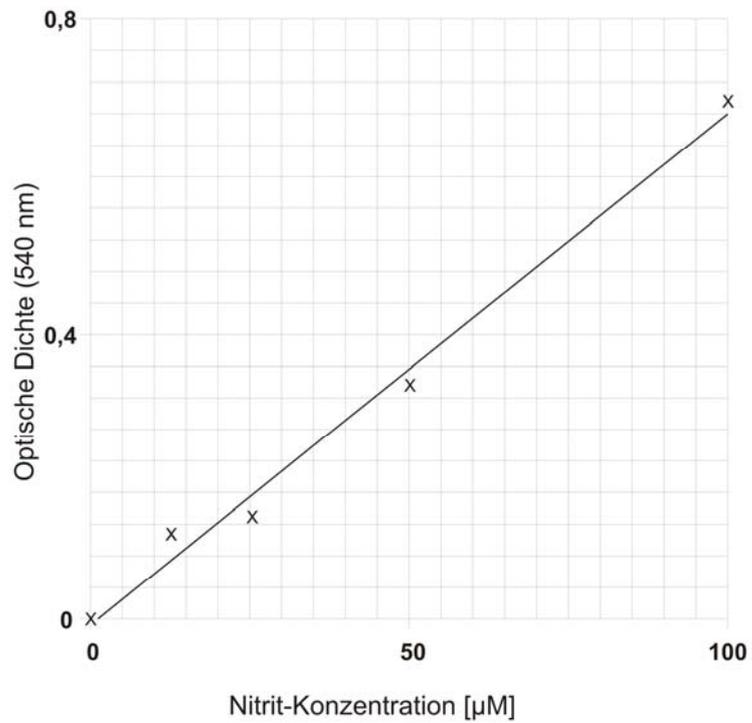
#### 4.6 NO-Freisetzung in Chondrozytenpellets

Wie bereits in Kap. 3.9 beschrieben, wurde die NOS-Aktivität über die Akkumulation von Nitrit, einem stabilen Oxidationsprodukt von NO, mit der Griess-Reaktion [74] im zellfreien Kulturüberstand nachgewiesen. Alle Messungen wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Während aller Versuchsreihen war eine kontinuierliche Zunahme des freigesetzten NO bzw. der Nitritkonzentration zu verzeichnen. Bei Zellpellets die im Standard-Differenzierungsmedium inkubiert wurden (Kontrolle) konnten Nitritkonzentrationen von durchschnittlich  $2,30 \pm 0,88$  bis  $8,55 \pm 1,01 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten gemessen werden. Die Kulturüberstände von Zellaggregaten, die unter dem Einfluss des NOS-Inhibitors L-NAA redifferenziert wurden, wiesen im Vergleich dazu mit  $0,75 \pm 0,53$  bis  $3,95 \pm 1,00 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten signifikant niedrigere ( $p < 0,05$ ) Nitritkonzentrationen auf.

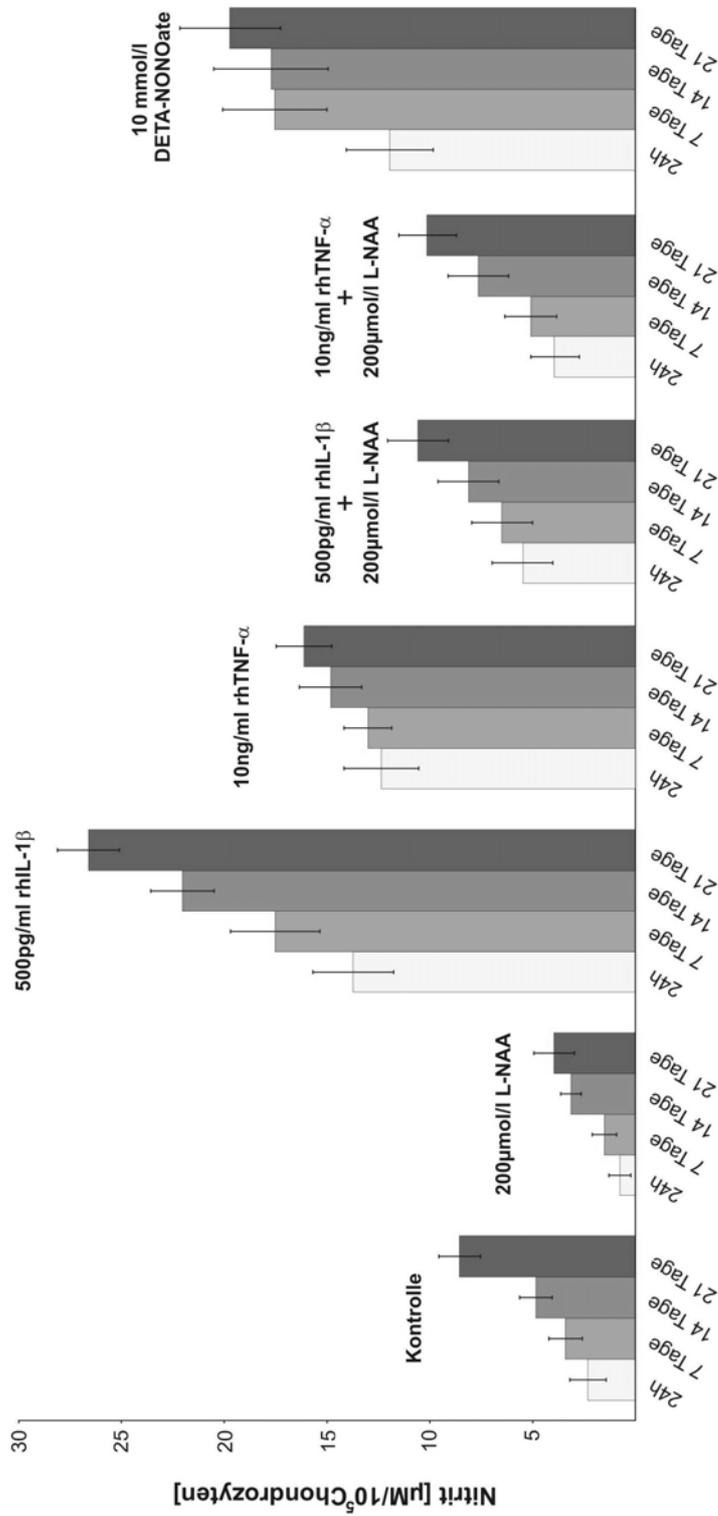
Mit  $13,73 \pm 1,97$  bis  $26,60 \pm 1,51 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten wurden im Medium der mit rhIL-1 $\beta$  (500pg/ml) stimulierten Pellets mit Abstand die höchsten Konzentrationen des gemessenen NO-Folgeproduktes registriert. Der Unterschied zur Kontrolle war hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Bei simultaner Zugabe von rhIL-1 $\beta$  und L-NAA in einer Konzentration von 500pg/ml bzw.  $200 \mu\text{mol}/\text{l}$  lagen die Messwerte mit  $5,48 \pm 1,55$  bis  $11,70 \pm 1,51 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten hoch signifikant niedriger als bei alleiniger Zugabe von rhIL-1 $\beta$ .

Für die Stimulation der Zellpellets mit 10ng/ml rhTNF $\alpha$  ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Nach Stimulation mit rhTNF $\alpha$  ergaben Werte zwischen  $12,35 \pm 1,81$  und  $16,13 \pm 1,35 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten. Der Unterschied zu Chondrozytenaggregaten, die unter Standardbedingungen redifferenziert wurden war auch hier hoch signifikant. Bei simultanem Einsatz von rhTNF $\alpha$  und L-NAA in einer Konzentration von 10ng/ml bzw.  $200 \mu\text{mol}/\text{l}$  fielen die gemessenen Nitritkonzentrationen auf  $3,93 \pm 1,16$  bis  $10,13 \pm 1,44 \mu\text{mol}/10^5$  Chondrozyten und lagen damit sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) unter denen bei alleinigem rhTNF $\alpha$ -Zusatz.



**Abb. 4.26: Nitrit-Standardkurve**

Die Nitrit-Standardkurve wurde anhand einer Verdünnungsreihe von 100µM – 0µM NaNO<sub>2</sub> in chondrogenem Differenzierungsmedium erstellt, deren Extinktion nach Zugabe von gleichen Teilen Griess-Reagenz 1 und 2 gemessen wurde. Die Darstellung bzw. Auftragung der Extinktion und der Konzentration erfolgte linear. Die Standardkurve zeigt zwischen 0 und 100 µM einen linearen Verlauf.



**Abb. 4.27: Graphische Darstellung der Messergebnisse für Nitrit im Zellkulturüberstand**

NO-Freisetzung in high-density-pellets unter Standardbedingungen (Kontrolle) und dem Einfluss verschiedener Modulatoren der NOS-Aktivität. Unter dem Einfluss des NOS-Inhibitors L-NAA wurde signifikant niedrigere ( $p < 0,05$ ) Nitritkonzentrationen gemessen als in der Kontrollgruppe. Die Stimulation mit rhIL-1 $\beta$  ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant höhere Nitrit-Werte. Bei simultanem Zusatz von rhIL-1 $\beta$  und L-NAA ergaben sich hoch signifikant niedrigere Werte für das gemessene NO-Folgeprodukt als bei alleinigem Zusatz von rhIL-1 $\beta$ . Unter rhTNF $\alpha$  lagen die Nitritkonzentrationen ebenso hoch signifikant über denen der Kontrollgruppe. Bei simultanem Zusatz von rhTNF $\alpha$  und L-NAA wurden sehr signifikant niedrigere Messwerte erzielt als bei alleinigem Zusatz von rhTNF $\alpha$ .

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der angewandten Methoden**

#### **5.1.1 Zellkulturen**

Manning und Bonner [130] etablierten 1967 die ersten Monolayerkulturen humaner adulter Chondrozyten. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche *in vitro*-Modelle entwickelt, um die einzelnen Komponenten des hyalinen Gelenkknorpels zu studieren [92]. Zusammen mit der rasanten Entwicklung molekularbiologischer Verfahren stehen damit heute Techniken zur Verfügung, mit deren Hilfe komplexe Interaktionen im Zellstoffwechsel analysiert und funktionelle Zusammenhänge besser erkannt werden können.

In den Untersuchungen zu dieser Arbeit kamen ein zweidimensionales sowie ein dreidimensionales Kulturmodell humaner artikulärer Chondrozyten zur Anwendung. Sowohl die zweidimensionale Monolayer- als auch die dreidimensionale Pelletkultur stellen geeignete *in vitro*-Modelle dar, den Metabolismus sowie Differenzierungsvorgänge humaner artikulärer Chondrozyten zu studieren [102, 159]. Beide Systeme sind jedoch mit Vor- und Nachteilen behaftet. Dreidimensionale Kulturen, wie die in dieser Arbeit eingesetzte Pelletkultur stellen eine Weiterentwicklung der Monolayer-Zellkultur dar. Solche Zellaggregate besitzen eine Architektur, die den *in vivo*-Bedingungen im menschlichen Organismus näher kommt, als zweidimensionale Kulturmodelle, lassen aber trotzdem eine Manipulation im Experiment zu. Als reine Zell-Matrix-Kultur ohne Zusatz- bzw. Fremdstoffe ist dieses Kultursystem histologischen, biochemischen als auch molekularbiologischen Untersuchungen leicht zugänglich und im Vergleich zu anderen dreidimensionalen Zellkultursystemen, wie beispielsweise der Perfusions- oder Rotationskultur [226] sehr kostengünstig. Die Ergebnisse solcher *in vitro*-Versuche können jedoch nicht uneingeschränkt auf *in vivo*-Bedingungen übertragen werden.

##### **5.1.1.1 Validität der angewandten Zellkulturmodelle**

Die Validität stellt ein Gütekriterium für Testverfahren dar, das beschreibt, wie geeignet ein Verfahren zur Abbildung eines zu messenden Sachverhaltes ist. Übertragen auf ein Zellkulturmodell für hyalinen Gelenkknorpel hängt die Gültigkeit der erzielten

Ergebnisse also davon ab, ob es sich bei den gezüchteten Zellen tatsächlich um Chondrozyten handelt. In der vorliegenden Arbeit sollten zudem Untersuchungen während der De- und Redifferenzierung humaner artikulärer Chondrozyten durchgeführt werden. Neben dem Differenzierungsstatus der Knorpelzellen zu Beginn der Untersuchung müssen daher auch deren funktionelle und morphologische Veränderungen im Zeitverlauf der Kultivierung belegt werden können.

Die Validität der eingesetzten Modelle wurde anhand morphologischer, histochemischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen bestätigt: Die isolierten Zellen zeigten stets charakteristische Eigenschaften (Differenzierungsmarker) humaner artikulärer Chondrozyten (vgl. Kap. 4 und Kap 5.2.1). Eine Kontamination mit anderen Zellen, beispielsweise Fibroblasten, konnte ausgeschlossen werden. Ebenso wurde der Differenzierungsstatus der Knorpelzellen während Expansion und anschließender Redifferenzierung an mehreren definierten Zeitpunkten kontrolliert (vgl. hierzu Kap. 5.2.1).

#### **5.1.1.2 Reliabilität der angewandten Zellkulturmodelle**

Unter Reliabilität versteht man die Zuverlässigkeit eines Testverfahrens. Sie ist ein Maß für die Wiederholbarkeit eines Tests mit identischen Ergebnissen.

Insgesamt wurden Chondrozyten aller 12 zur Verfügung stehender Spender in Monolayerkultur vermehrt und anschließend in der Pelletkultur rekultiviert. Dabei konnte bei allen Zellen während deren Expansion ein Verlust charakteristischer morphologischer und funktioneller Eigenschaften nachgewiesen werden, wie er für den Prozess der Dedifferenzierung kennzeichnend ist. Alle expandierten Zellen konnten durch die anschließende Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium zur Redifferenzierung gebracht werden. Während der Expansion in Monolayerkultur sowie der Redifferenzierung in Pelletkultur konnten keine signifikanten qualitativen oder quantitativen Unterschiede im Genexpressionsverhalten zwischen den verschiedenen Chondrozytenpopulationen festgestellt werden. Lediglich die Chondrozyten des jüngsten Spenders (34 Jahre) zeigten im Verlauf der Expansion eine deutlich höhere Proliferationsrate.

Die unabhängige Wiederholung einzelner Untersuchungsschritte, wie beispielsweise die Stimulation der Zellen mit Zytokinen erbrachte stets übereinstimmende Ergebnisse. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die verwendeten Zellkulturmodelle eine *in vitro*-Untersuchung der Expansion und Redifferenzierung isolierter humaner artikulärer Chondrozyten unter standardisierten Kultur- und Testbedingungen erlauben.

### **5.1.2 Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen**

Bei jeder am Präparat nachgewiesenen Struktur handelt es sich letztlich um das Resultat eines molekularen Vorgangs [106]. Daher stellen sowohl die klassische Histochemie als auch die Immunhistochemie ein Bindeglied zwischen Morphe und Funktion dar.

#### **5.1.2.1 Alzian-Blau-Färbung**

Bei Alzian-Blau handelt es sich um eine bewährte histochemische Färbung zum Nachweis knorpelspezifischer Stoffwechselprodukte [10, 12, 21, 88, 118, 130]. Die Proteoglycane des hyalinen Gelenkknorpels sind besonders reich an Chondroitinsulfat [32, 34, 106], einem Glykosaminoglykan mit außerordentlich hoher Dichte an Sulfatgruppen. Der Farbstoff Alzian-Blau bindet relativ spezifisch und hoch sensitiv an die Sulfatgruppen dieser Knorpel-Glykosaminoglykane [118].

Trotz ihrer im Vergleich zur Immunhistochemie geringeren Spezifität spielt diese Färbung beim Nachweis des charakteristischen Phänotyps von Chondrozyten weiterhin eine bedeutende Rolle. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität können qualitative und quantitative Veränderung der gebildeten Proteoglycane, wie sie bei der De- und Redifferenzierung von Chondrozyten auftreten, effizient belegt werden. Die mit der Alzian-Blau-Färbung erhobenen Daten korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen (vgl. Kap 4.2 und 4.5.4). Diese histochemische Färbung stellt somit eine geeignete Methode zum Nachweis des charakteristischen differenzierten Phänotyps von Chondrozyten dar.

### **5.1.2.2 Immunhistochemie – Kollagen Typ II**

Der immunhistologische Vergleich von verhältnismäßig kleinen Zellaggregaten ist mit Problemen behaftet. Die Antikörper und Färbesubstratlösung selbst können durch unspezifische Bindung Artefakte produzieren. Das Auftreten dieser Artefakte ist jedoch abhängig von den Gewebeproben, zum Beispiel deren Fettgehalt, den verwendeten Antikörpern und den Verhältnissen während der Inkubation. Durch strikte Einhaltung der im Färbeprotokoll geforderten Bedingungen konnten Artefakte weitestgehend vermieden werden.

Immunhistochemische Methoden sind um so spezifischer, je reiner der bzw. die verwendeten Antikörper sind. Für die indirekten Immunperoxidase-Methode wurde als Primär-Antikörper ein in der Maus gezüchteter monoklonaler Antikörper verwendet, der spezifisch humanes Kollagen Typ II bindet. Gegen Kollagen Typ II gerichtete Antikörper können als klassischer immunhistochemischer Marker für differenzierte Chondrozyten angesehen werden [8, 11, 12, 19, 50, 66, 79, 110, 114, 126-128, 162, 182, 197, 205, 217, 223, 224]. Durch indirekte immunhistochemische Methoden kann die Empfindlichkeit des Nachweises nochmals deutlich gesteigert werden.

### **5.1.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eines der sensitivsten Verfahren zur Genexpressionsdetektion [179].

Die erhaltenen RT-PCR-Amplifikate wurden zur Überprüfung sequenziert. In allen Fällen wurde die NOS-spezifische Sequenz nachgewiesen und damit die Amplifikation eines anderen (falschen) Zielmoleküls gleicher Größe ausgeschlossen. Die verwendeten Primerpaare wurden zudem Intron-überspannend gewählt, d.h. die Sequenzen der Primerpaare liegen auf unterschiedlichen Exonen des Gens. PCR-Produkte genomischer DNA (Kontamination) wären so aufgrund des mitamplifizierten Introns deutlich größer gewesen [160]. Dies war jedoch bei keiner Reaktion der Fall. Die RT-PCR-Amplifikate hatten stets die erwartete Größe.

Revers transkribierte cDNA von Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), einem Enzym der Glykolyse wurde als positive Expressionskontrolle bzw. interner Standard in den RT-Reaktionsansätzen aller Experimente amplifiziert. Als

interne Standards dienen generell Gene, welche nach aktuellem Stand der Wissenschaft keiner transkriptionellen Regulation unterliegen, d.h. selbst im Fall einer starken Veränderung des Aktivitätszustandes der Zelle nicht oder nur unwesentlich verändert exprimiert werden (konstitutive Expression). Dies ist für das *housekeeping*-Gen GAPDH der Fall. Die erfolgreiche Amplifikation dieser mRNA bewies die Präparation intakter RNA und zeigte darüber hinaus, dass alle Komponenten der RT-PCR funktionierten. Die GAPDH-mRNA-Expression in den untersuchten Proben war unter allen Versuchsbedingungen gleich stark.

Die Amplifikation der zum entsprechenden Gen korrespondierenden mRNA beweist die Expression dieses Gens auf transkriptioneller Ebene. Über die post-transkriptionelle Ebene können anhand dieser Untersuchungsmethode jedoch keine Aussagen getroffen werden.

### **5.1.4 Indirekte Messung des freigesetzten NO mit dem Griess-Assay**

Die Griess-Reaktion [74] eine einfache Methode zur indirekten Bestimmung von NO. Das Messprinzip dieser Methode beruht auf einer Azokupplung von Nitrit an ein Naphthylethylendiamin und der spektrophotometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion. Die Absorption dieses Produkts bei 540 nm ist proportional zu der Nitritkonzentration in der Probe.

Die Sensitivität der Griess-Reaktion ist, nach Erfahrung aus Vorversuchen für die geplanten Messungen ausreichend. Eine mögliche Fehlerquelle bei der spektrophotometrischen Bestimmung des freigesetzten NO anhand dieser Messmethode besteht, in der vorliegenden Arbeit, jedoch in der Tatsache, dass im verwendeten chondrogenen Differenzierungsmedium Phenolrot enthalten ist. Phenolrot wird in Zellkulturmedien als Indikator zur Kontrolle des pH-Werts eingesetzt. Bei pH 7,4 ist es rot und besitzt ein ähnliches Absorptionsmaximum wie der, bei der Griess-Reaktion gebildete Farbkomplex. Da die angewandten Zellkulturmodelle geschlossene Systeme sind, sinkt der pH-Wert in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der Chondrozyten stetig ab. Bei einem pH 6,5 ist Phenolrot schließlich gelb und weißt ein Absorptionsmaximum bei 430 bis 435 nm auf. Somit sind die erhaltenen Messwerte zumindest in gewissem Umfang vom pH-Wert des Zellkulturüberstandes abhängig.

Neben der Griess-Reaktion existieren zahlreiche weitere Möglichkeiten der Quantifizierung der NO-Freisetzung, wie beispielsweise die elektrochemische Messung an einer NO-Elektrode. Für bestimmte Fragestellungen bieten diesen Verfahren anwendungstechnische Vorteile, sind in der Regel jedoch deutlich kostenintensiver und aufwendiger als die in dieser Arbeit verwendete indirekte Messmethode nach Griess.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Charakterisierung des zellulären Phänotyps im zeitlichen Verlauf der Kultivierung**

#### **5.2.1.1 Zellmorphologie und Wachstumsverhalten**

Morphologisch zeigten die isolierten Zellen nach Aussaat in zweidimensionaler Monolayerkultur ein für differenzierte Chondrozyten charakteristisches Verhalten. Wie von den Autoren Mallein-Gerin et al. [128] beschrieben, behielten sie nach Adhärenz am Boden der Zellkulturflasche ihre runde Form für noch etwa 48 Stunden bei. Erst danach erfolgten deutliche Veränderungen ihrer äußeren Erscheinungsmerkmale, die bei Kenntnis der entsprechenden Literatur [5, 89, 162, 197, 224] nur als Kennzeichen einer Entdifferenzierung interpretiert werden können: Es kam zu einer auffälligen Ausbreitung (Spreading) und Abflachung der Zellen. Die ursprünglich rundlich-polygonalen Chondrozyten vervielfachten im weiteren Verlauf der Kultivierung ihre Größe und nahmen schließlich eine bipolare, fibroblastenähnliche Gestalt mit langen Zytoplasmaausläufern an. Für diese morphologischen Veränderungen benötigten die Zellen nach ihrer Aussaat stets mehrere Tage. Fibroblasten würden in Monolayerkultur bereits nach wenigen Stunden ein ähnliches Bild zeigen [128]. Ein verzögertes Spreading kann somit als Charakteristikum differenzierter Chondrozyten gewertet werden. Die Autoren Mallein-Gerin et al. [128] schließen bei einem Fehlen solcher sich schnell ausbreitender Zellen eine Kontamination der Kultur durch Fibroblasten aus.

Alle Zellkulturen wurden in der Anfangsphase täglich mikroskopisch kontrolliert. Beobachtungen, die auf eine Verunreinigung der Monolayerkulturen, z.B. mit Fibroblasten hindeuten könnten, wurden dabei nicht gemacht.

### **5.2.1.2 Histochemische und immunhistochemische Charakterisierung des zellulären Phänotyps**

#### **5.2.1.2.1 Histochemie – Alzian-Blau-Färbung**

Während der Rekultivierung der expandierten Zellen als high-density-pellets konnte perizellulär eine deutliche Zunahme von Alzian-Blau-positivem Material nachgewiesen werden. Zellaggregate, die nach 7 Tagen histologisch aufgearbeitet wurden ließen keine Anfärbbarkeit erkennen. Nach 14 und 21 Tagen angefertigte Gefrierschnitte zeigten stets stark oder sehr stark positive Reaktion auf den verwendeten Farbstoff.

Offenbar hatten die Chondrozyten während der Expansion in Monolayerkultur die für ihren differenzierten Phänotyp charakteristische Synthese knorpelspezifischer Glykosaminoglykane eingestellt oder zumindest so stark reduziert, dass sie mit der beschriebenen, äußerst sensitiven Methode nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Während der Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium lagerten die kultivierten Chondrozyten dann eindeutig neugebildete Matrixproteine ab, die reich an Sulfatgruppen waren. Dies belegt die Redifferenzierung der expandierten Gelenkknorpelzellen.

Bei lichtmikroskopischer Auswertung der aufbereiteten Präparate fiel regelmäßig die geringere Anfärbbarkeit eines dünnen, ca. 1 bis 2 Zelldurchmesser breiten Randbereichs der Zellpellets auf (vgl. Abb. 4.9). Die verminderte Anfärbbarkeit dieser Randzone lässt sich im angewendeten Zellkulturmodell durch die stark reduzierte Möglichkeit zur Akkumulation der neu synthetisierten Matrixproteine in diesem Bereich erklären. Ein Grossteil der von den Zellen dieser Zone gebildeten Matrixproteine wird vermutlich in das umgebende Medium abgegeben und bei den alle 48 Stunden durchgeführten Medienwechseln entfernt. Somit fehlen in diesem Areal die Zielstrukturen der angewendeten Färbung.

Eine weitere mögliche Begründung wäre die unvollständige Redifferenzierung der Zellen dieser schmalen Randzone. Die Anforderungen, wie sie für eine erfolgreiche Wiederausbildung knorpeltypischer Eigenschaften an die Kulturmethode gestellt werden sind in diesem Bereich des Zellaggregats nur unzureichend erfüllt. Dies gilt besonders für die geforderte diffusionslimitierte Nährstoffzufuhr [33, 38, 49] und die

bereits erwähnte Möglichkeit zur perizellulären Akkumulation knorpelspezifischer Matrixbestandteile [33, 38, 49].

Bei Erhöhung der Zellzahl auf bis zu  $2 \times 10^6$  Zellen pro Pellet, wie in Vorversuchen geschehen, bot sich ein noch extremeres Bild. Hier konnte eine dreischichtiger, konzentrischer Aufbau aus einer äußeren Zone, einer Intermediärzone und einer zentralen Nekrosezone beobachtet werden. Ein derartiger Befund kann in vielen Sphäroid-Modellen beobachtet werden [61, 150]. Durch kritische Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen kommt es dabei zur Ausbildung einer zentral gelegenen Nekrosezone, wobei deren Auftreten und Ausmaß vom Sphäroiddurchmesser (Diffusionsstrecke) und damit indirekt von der Zellzahl abzuhängen scheint [61].

Bei Einhaltung einer Zellzahl von 200.000 bis 250.000 waren histologisch keine Anzeichen von extremen Mangelbedingungen zu beobachten. Die innere Zone zeigte stets einen homogenen Aufbau.

#### **5.2.1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ II**

Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an Gefrierschnitten von Zellaggregaten belegen ebenfalls die Veränderungen des Antigenexpressionsverhaltens der expandierten Zellen während deren Rekultivierung in einem chondrogenen Differenzierungsmedium. Die in Monolayerkultur expandierten Chondrozyten hatten augenscheinlich die Biosynthese von Kollagen Typ II deutlich herunterreguliert bzw. eingestellt. Am Versuchstag 7 war dieser Marker immunhistochemisch nicht darstellbar. An Gefrierschnitten, die nach Abschluss der Rekultivierung am Versuchstag 21 angefertigt wurden, konnte dagegen stets eine stark positive Immunreaktivität beobachtet werden. Die expandierten Chondrozyten hatten folglich ihre zuvor verloren gegangene Syntheseleistung für dieses knorpelspezifische Matrixprotein wieder ausgebildet.

#### **5.2.1.3 RT-PCR-Untersuchungen zur Charakterisierung des zellulären Phänotyps**

Mittels semiquantitativer RT-PCR-Untersuchungen wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, von Aggrecan sowie von Kollagen Typ I und II analysiert.

#### **5.2.1.3.1 Aggrecan**

Aggrecan ist das größte und quantitativ bedeutendste Proteoglycan der Extrazellulärmatrix des adulten Gelenkknorpels. Es neigt dazu riesige Aggregate aus Hunderten von Aggrecanmolekülen zu bilden, deren Molekulargewicht bis zu mehreren Millionen Dalton betragen kann. Ihre besondere Eigenschaft ist das hohe Wasserbindungsvermögen. Damit sind sie verantwortlich für die hohe Druckbelastbarkeit des Knorpels von ca. 1,5 kg/mm<sup>2</sup> Querschnitt [117].

Der knorpelspezifische Marker Aggrecan war während der Expansion in Monolayerkultur extrem herunterreguliert. Nach Erreichen der Konfluenz konnte ein geringfügiger Anstieg seiner Genexpression detektiert werden. Die anschließende Reaktivierung der expandierten Zellen in Form von high-density-pellets führte zu einer sukzessiven Steigerung der Expression von Aggrecan. Die höchste Konzentration der nachzuweisenden RNA-Transkripte war bei Abschluss der Redifferenzierung am Versuchstag 21 nachweisbar.

#### **5.2.1.3.2 Kollagen Typ I und II**

Kollagen Typ I wird u.a. von Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten synthetisiert. Es bildet die Fibrillen des lockeren und straffen kollagenen Bindegewebes sowie des Knochens [51]. Eine Ausnahme stellt der hyaline Knorpel dar. Hier kommt Kollagen Typ I physiologischerweise nicht vor [32].

Kollagen Typ II ist auf den Knorpel beschränkt. Es setzt sich aus drei gleichen alpha<sub>1</sub>-Typ II-Ketten zusammen und ist besonders reich an Hydroxylysin. Hydroxylysin ist in der Lage sowohl Tropokollagenmoleküle als auch Dissaccharide zu verbinden und dadurch ein Netzwerk auszubilden, das als Grundgerüst der chondralen Extrazellulärmatrix fungiert. Zudem wirkt es dem osmotischen Schwellungsdruck der Proteoglycane entgegen [30, 133].

Die für einen Verlust des differenzierten Phänotyps von Chondrozyten charakteristische Expression von Kollagen Typ I an der Stelle von Kollagen Typ II [8, 11, 12, 19, 50, 66, 79, 110, 114, 126-128, 162, 182, 197, 198, 204, 205, 217, 223, 224, 233] konnte anhand von RT-PCR-Untersuchungen eindeutig belegt werden (vgl. Kap. 4.5.5 und 4.5.6). In proliferierenden Monolayerkulturen konnte Kollagen Typ II-mRNA nur sehr schwach

nachgewiesen werden. Die Expression von Kollagen Typ I war dagegen stark hochreguliert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde eine geringe Zunahme des knorpelspezifischen Kollagen Typ II beobachtet. Während der Rekultivierung als Zellaggregate in einem chondrogenen Differenzierungsmedium konnte eine kontinuierliche Abnahme der Kollagen Typ I-mRNA-Spiegel bei gleichzeitiger Zunahme der Kollagen Typ II-Expression beobachtet werden. Am Ende der Redifferenzierung war Kollagen Typ I-mRNA nicht mehr nachweisbar. Die höchste Expression des knorpelspezifischen Markergens Kollagen Typ II wurde regelmäßig am Versuchsende nach 21 Tagen detektiert. Die Ergebnisse von Kollagen Typ II korrelierten exakt mit denjenigen von Aggrecan.

#### **5.2.1.4 Schlussfolgerung**

Die aufgeführten Ergebnisse lassen folgenden Schluss zu: Während der Primärkultur, der aus humanem hyalinen Gelenkknorpel isolierten Chondrozyten kam es zu einem Verlust von charakteristischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Marker wie Kollagen Typ II und Aggrecan, die in der Literatur als entscheidende Kriterien für den differenzierten Phänotyp artikulärer Chondrozyten geführt werden, konnten nicht mehr oder nur noch grenzwertig nachgewiesen werden. Die Kriterien für eine Dedifferenzierung der Zellen sind somit erfüllt.

Die expandierten Chondrozyten wurden anschließend durch Zentrifugation zu dichten Aggregaten zusammengelagert und für 21 Tage in einem chondrogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Unter diesen Bedingungen konnten die expandierten Zellen zur Redifferenzierung gebracht werden. Morphologische, histo- und immunhistochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen belegten die Wiederausbildung charakteristischer phänotypischer Eigenschaften differenzierter artikulärer Chondrozyten. Die leichte, aber dennoch nachweisbare Zunahme der Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan in der Monolayerkultur nach Erreichen der Konfluenz kann durch eine beginnende Redifferenzierung der expandierten Chondrozyten erklärt werden. Bedingungen, wie sie an Kultivierungssysteme für den Erhalt oder das Wiedererlangen eines differenzierten Phänotyps gestellt werden [33, 38, 49] waren nach Erreichen des Konfluenzstadiums bereits teilweise erfüllt. Dies trifft

insbesondere auf die Möglichkeit zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu. So beobachteten bereits Chacko und Mitarbeiter [41] bei Primärkulturen im Stadium der Präkonfluenz zunächst eine Entdifferenzierung der Chondrozyten, der nach Erreichen der Konfluenz eine Redifferenzierung mit Ausbildung einer charakteristischen Extrazellulärmatrix folgte.

### **5.2.2 Genexpression der NOS-Isoformen während Expansion und Redifferenzierung humaner artikulärer Chondrozyten**

Sowohl das nNOS- als auch das eNOS-Gen konnte an allen Untersuchungszeitpunkten der Expansion in Monolayer- und Redifferenzierung in Pelletkultur nachgewiesen werden. Quantitative Unterschiede dieser mRNAs zeigten sich im Zeitverlauf der Kultivierung nicht.

Unmittelbar nach der enzymatischen Isolierung der Chondrozyten aus der sie umgebenden Extrazellulärmatrix war die Expression der iNOS-mRNA nur schwach nachweisbar. Während der Expansion der Zellen in Monolayerkultur konnte bei proliferierenden Zellen eine leicht geringere Expressionsstärke beobachtet werden als bei Chondrozyten nach Erreichen der Konfluenz. Im Verlauf der 21tägigen Redifferenzierung der expandierten Knorpelzellen in Pelletkultur kam es zu einer sukzessiven Zunahme der iNOS-Transkripte (vgl. Abb. 4.14). Die stärksten gemessenen Banden zeigten sich dabei regelmäßig bei Abschluss der Redifferenzierung.

Den Autoren Charles et al. [42] gelang 1993 erstmals der Nachweis der induzierbaren Isoform der NOS in menschlichen Chondrozyten, allerdings erst nach Induktion durch IL-1 $\beta$ . Bei Arthrose-Patienten wurde von Amin et al. [4] die Expression einer Sonderform der NOS (osteoarthritic NOS, OA-NOS) postuliert, die der neuronalen Isoform stark ähneln sollte, in späteren Untersuchungen aber als iNOS identifiziert wurde [142, 227]. In der vorliegenden Arbeit konnte neben der iNOS somit erstmals die Expression der beiden anderen NOS-Isoformen, nNOS und eNOS, belegt werden. Der Nachweis der iNOS-mRNA gelang zudem ohne vorhergehende Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Die Amplifikation der zu den entsprechenden Genen korrespondierenden mRNA beweist die Expression der Gene auf transkriptioneller Ebene. Über die posttranskriptionelle Ebene können anhand dieser Untersuchungsmethode keine Aussagen

getroffen werden. Ob es sich bei der regelmäßig festgestellten Zunahme der iNOS-Expression im Zeitverlauf der Redifferenzierung um einen physiologischen Befund oder um die Folge der nicht-physiologischen Kulturbedingungen handelt, bleibt ebenso offen. Beides bedarf der weiteren Abklärung.

Unabhängig von Alter und Geschlecht des Spenders wurden hierbei übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

### **5.2.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener, potentiell NOS-modulierender Cytokine auf humane artikuläre Chondrozyten**

#### **5.2.3.1 Einfluss von TGF $\beta$ auf die Genexpression der NOS-Isoformen**

Der Wachstumsfaktor *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ) ist Mitglied einer Superfamilie von Polypeptiden, die in charakteristischer Weise an Steuerungsprozessen im Zellstoffwechsel beteiligt sind. Aus menschlichem Gewebe wurden 3 verschiedene Isoformen isoliert: TGF $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3. Die 3 Subtypen variieren nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz. Qualitative Unterschiede in ihrer Wirkung auf Chondrozyten wurden bisher nicht beschrieben.

Tendenziell scheint TGF $\beta$  auf Zellen mesenchymalen Ursprungs aktivierend und proliferationssteigernd zu wirken. In chondralen [94] und in osteochondralen [46] Defekten stimuliert er die Chondrogenese, was darauf schließen lässt, dass pluripotente perichondrale Zellen unter dem Einfluss dieses Wachstumsfaktors möglicherweise in die chondrale Linie differenzieren [122]. Neben seiner mitogenen Wirkung [7, 24] stimuliert es in Chondrozyten die Biosynthese knorpelspezifischer Proteoglycane. Für den Matrix-Stoffwechsel des gesunden Knorpels hat TGF $\beta$  wichtige regulatorische Funktion. Er verändert das Verhältnis von Chondroitin-6-Sulfat und Chondroitin-4-Sulfat in der extrazellulären Matrix [180].

Darüber hinaus spielt es allem Anschein nach auch bei der Reparatur von Matrixdefekten eine Rolle. So wird die Steigerung der Kollagensynthese durch erhöhte TGF $\beta$ -Expression bei rheumatoider Arthritis und Arthrose als körpereigener Reparaturversuch verstanden [184, 215]. Trotz allem ist unbekannt, inwiefern TGF $\beta$  im Laufe der Alterung die Synthese von Glykosaminoglykanen im normalen Knorpelgewebe modifiziert [86]. Auffallend ist, dass dieser Wachstumsfaktoren sowohl

die anabolen als auch die katabolen Stoffwechselprozesse des Chondrozyten beeinflusst. Er erhöht nicht nur die Proteoglycansynthese, sondern vermindert auch deren Abbau indem er die Freisetzung von Proteasen hemmt und die Expression sogenannter *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMPS) induziert [143].

Chondrozyten-Aggregate, die in einem chondrogenen Differenzierungsmedium ohne rhTGF $\beta$ -Zusatz kultiviert wurden, zeigten eine im Vergleich zu Kontrollen höhere Expression der iNOS. Auf die Genexpression der beiden anderen NOS-Isoformen hatte rhTGF $\beta$  keine nachweisbaren Auswirkungen. Ein analoger Effekt von TGF $\beta$  wurde in der Literatur bereits für zahlreiche andere Zelltypen beschrieben. So beobachteten beispielsweise Perrella et al. und Pinsky et al. einen hemmenden Effekt von TGF $\beta$  auf die Transkription der iNOS in glatten Muskelzellen [170] bzw. Cardiomyozyten [175].

### **5.2.3.2 Einfluss von Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) und Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) auf humane artikuläre Chondrozyten**

Interleukin-1 (IL-1) wurde ursprünglich als ein von Monozyten und Makrophagen sezerniertes Protein beschrieben, das immunmodulatorische Funktion besitzt. Es existieren zwei verschiedene Isoformen, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die beide eine ähnliche biologische Aktivität zeigen. Die Stimulation von Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  führt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Induktion der iNOS mit konsekutivem Anstieg der NO-Konzentration [72, 207].

Die katabole Wirkung von IL-1 $\beta$  auf Knorpel und Knochengewebe wurde in zahlreichen Studien belegt. In Chondrozyten umfasst sie in erster Linie eine starke Verminderung der Neusynthese von Proteoglycanen [17, 100, 220, 232] sowie der Produktion knorpelspezifischer Kollagene [69, 221]. Nicht-knorpelspezifische Kollagene werden dagegen unter dem Einfluss dieses Zytokins vermehrt synthetisiert [69, 71]. Bewirkt werden diese Effekte in erster Linie über die Ebene der Transkription [70].

IL-1 $\beta$  wird eine Hauptrolle in der Entzündungsreaktion und Gelenkdestruktion bei rheumatoider Arthritis und Arthrose [67] zugeschrieben. Alleine oder in Kombination mit TNF $\alpha$  stimuliert IL-1 $\beta$  aktivierte Makrophagen und Fibroblasten zur Sekretion von

Matrixmetalloproteinasen und Aggrecanasen, Enzyme, welche die Matrixproteine abbauen und damit zur Zerstörung des Knorpels beitragen.

Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) ist ein pleiotropes Zytokin. Die wichtigsten TNF $\alpha$ -Produzenten im Organismus sind aktivierte Makrophagen und Monozyten, insbesondere nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) [87]. Gemeinsam mit den Interleukinen (IL)-1 $\alpha$  und - $\beta$  sowie Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ist TNF $\alpha$  ein wichtiger Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort. Daneben werden TNF $\alpha$  eine Vielzahl weiterer immunregulatorischer, proinflammatorischer und pathophysiologischer Wirkungen zugeschrieben. So dienen beispielsweise geringe Konzentrationen der physiologischen Abwehr von Infektionen (z.B. durch Bakterien oder Viren). Die Beteiligung des Zytokins an der Pathogenese einer Reihe von Krankheitsbildern wie z.B. rheumatoider Arthritis ist gesichert. Auf Knorpelgewebe übt dieser Mediator stark katabole Wirkung aus. So führt TNF $\alpha$  zu vermehrter Apoptose der Chondrozyten, einem Anstieg der Kaspase-Aktivität [1, 163] sowie zu einer konzentrationsabhängigen reversiblen Suppression der Proteoglycansynthese [230] und der Expression knorpelspezifischer Kollagene (II, IX, XI) [181, 202].

Die Stimulation humaner artikulärer Chondrozyten mit rhIL-1 $\beta$  bzw. rhTNF $\alpha$  während verschiedener Stadien der Redifferenzierung führte, wie mehrfach in der Literatur beschrieben [72, 207], zu einer deutlichen Induktion der iNOS. Die Expression der neuronalen NOS wurde durch die beiden verwendeten proinflammatorischen Zytokine nicht beeinflusst. Für das eNOS-Gen fand sich sowohl nach rhIL-1 $\beta$ - als auch nach rhTNF $\alpha$ -Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpellets eine Abnahme der Expression. Quantitative Veränderungen der eNOS-Genexpression wurden für andere Zellpopulationen bereits in verschiedenen Studien belegt. So beschrieben beispielsweise MacNaul und Hutchinson eine „down“-Regulation der eNOS-Expression in humanen Aorta-Endothelzellen nach Inkubation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder INF $\gamma$  [124].

Eine Regulation der Kollagen Typ II- und Aggrecan-Expression konnte für beide eingesetzte proinflammatorische Zytokine nachgewiesen werden. rhIL-1 $\beta$  hatte im verwendeten Zellkulturmodell ebenso einen deutlich negativen Effekt auf die Expression der beiden untersuchten Matrixproteine wie rhTNF $\alpha$ . Die Menge der Kollagen Typ II- und Aggrecan-Transkripte in der isolierten Gesamt-RNA nahm stark

ab. Eine Abhängigkeit der erzielten Wirkung vom Differenzierungsstatus der Zellen konnte dabei nicht beobachtet werden.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen [40, 213] deuten darauf hin, dass der Effekt von IL-1 $\beta$  auf die Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan zumindest teilweise über NO vermittelt wird. Um zu untersuchen inwieweit diese Hypothese auf IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zutrifft wurden Zellaggregate humaner artikulärer Chondrozyten unter simultanem Einfluss von rhIL-1 $\beta$  und L-NAA bzw. rhTNF $\alpha$  und L-NAA inkubiert.

Der negative Effekt von rhIL-1 $\beta$  und rhTNF $\alpha$  auf die Expression der beiden Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan war bei Zusatz des verwendeten NOS-Inhibitors zumindest teilweise reversibel. Zellaggregate, die gleichzeitig sowohl mit 500pg/ml rhIL-1 $\beta$  und 100 $\mu$ mol/l L-NAA bzw. 10ng/ml rhTNF $\alpha$  und 100 $\mu$ mol/l L-NAA inkubiert wurden zeigten eine NO-Freisetzung, die sehr signifikant niedriger war als bei alleinigem Zusatz des entsprechenden proinflammatorischen Zytokins. Die Expression der beiden chondrogenen Marker war bei simultanem Zusatz von rhIL-1 $\beta$  und L-NAA bzw. rhTNF $\alpha$  und L-NAA deutlich stärker als bei alleiniger Stimulation mit den eingesetzten Mediatoren. Die Bandenstärke von Zellpellets die in Standard-Differenzierungsmedium inkubiert worden waren, wurde allerdings nicht erreicht.

NO stellt somit höchstwahrscheinlich nicht den einzigen Weg dar über den IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zu einer Verminderung der mRNA-Expression von Kollagen-Typ II und Aggrecan führen.

### **5.2.4 Physiologische Bedeutung von NO für humane artikuläre Chondrozyten**

Zahlreichen Untersuchungen nach fungiert NO im Knorpelgewebe als ein wichtiger Regulator im sensiblen Gleichgewicht zwischen der Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine und dem Matrixabbau dar [40, 55, 84, 211, 213, 216]. Höhere Wirkspiegel dieses Botenstoffes können Knorpelgewebe schädigen bzw. zerstören. NO kann in Abhängigkeit von seiner Konzentration und Einwirkzeit in Chondrozyten Apoptose induzieren [3, 22, 82, 83, 108, 123, 168, 222]. Weiterhin kommt zu einer Verschiebung von anabolen hin zu katabolen Stoffwechselprozessen. So scheint NO die Synthese wichtiger knorpelspezifischer Matrixproteine wie Kollagen Typ II und

Aggrecan zu hemmen. Des Weiteren besitzt es einen möglichen Effekt auf die Differenzierung humaner artikulärer Chondrozyten.

Um diese Hypothese zu untermauern wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des NO-Donors DETA-NONOate auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan untersucht. In weiteren Versuchen wurde die Wirkung des NOS-Inhibitor N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin auf die Redifferenzierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten überprüft.

#### **5.2.4.1 Einfluss des NO-Donors DETA-NONOate auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan**

2,2'-(Hydroxynitrosohydrazino)bis-ethanamine (DETA-NONOate) ist ein langwirkender NO-Donor. Er dissoziiert pH-abhängig in einer Reaktion erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 20 Stunden bei 37°C (pH 7.4). Pro Mol verbrauchtes DETA-NONOate werden 2 Mol NO freigesetzt.

Unter dem Einfluss dieses NO-Donors in einer Konzentration von 10mmol/l konnte eine deutliche Suppression der beiden untersuchten Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan beobachtet werden (vgl. Abb. 4.22).

Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zu Beobachtungen der Autoren Cao et al.. Sie untersuchten in einer 1997 veröffentlichten Studie [40] ebenfalls den Einfluss von NO auf die Synthese bzw. Expression von Kollagen Typ II artikulärer Knorpelzellen. Als NO-Donor verwendeten sie S-Nitroacetyl-Penicillamin (SNAP) in einer Konzentration von 100µM bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Für die gewählten Parameter konnten die Autoren keine merkliche Reduktion der Kollagen II-mRNA-Menge registrieren. Sie folgerten daraus, dass die Inhibition der Kollagen II-Synthese durch NO überwiegend auf translationaler oder posttranslationaler Ebene bewirkt wird. Jedoch wurden diese Ergebnisse, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, nicht an einem humanen dreidimensionalen *in vitro*-Modell gewonnen, sondern an Monolayerkulturen tierischer Gelenkknorpelzellen (Neuseeland Hasen), die bekanntermaßen weniger gut differenzieren. Der von den Autoren Cao et al. eingesetzte NO-Donor besitzt zudem eine Halbwertszeit von lediglich 1,15h [138]. Eine

einigermaßen konstante Freisetzung von NO ist somit im Unterschied zu dem, in der dieser Studie verwendeten DETA-NONOate nicht gegeben.

#### **5.2.4.2 Einfluss des NOS-Inhibitor N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin auf die Redifferenzierung expandierter humaner artikulärer Chondrozyten**

Der NOS-Hemmer N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin (L-NAA) gehört zur Gruppe L-Argininanaloga, einer der in der NOS-Forschung am häufigsten eingesetzten Substanzgruppen. L-NAA führt zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Inaktivierung aller 3 NOS Isoformen [225, 231]. Es verdrängt kompetitiv L-Arginin von seiner Bindungsstelle und inhibiert so die L-Citrullin- und NO-Bildung [231].

Um den Einfluss des NOS-Inhibitors L-NAA auf die Redifferenzierung dedifferenzierter (expandierter) Gelenkchondrozyten zu untersuchen, wurden frisch angelegte Zellpellets für 21 Tage in einem chondrogenen Differenzierungsmedium inkubiert, dem L-NAA in einer Konzentration von 200µmol/l zugefügt wurde. Als Kontrolle wurden Pellets aus Zellen der gleichen Monolayerkultur verwendet, deren Differenzierungsmedium den verwendeten NOS-Inhibitor nicht enthielt.

Der Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAA führte zu einer signifikanten Reduktion des freigesetzten NO, gemessen an der Akkumulation des NO-Folgeproduktes Nitrit. Dies hatte einen positiven Einfluss auf die Redifferenzierung der expandierten Chondrozyten. Im Vergleich zu Kontrollen ließ sich dadurch eine frühere bzw. höhere Expression der beiden knorpelspezifischen Markergene Kollagen Typ II und Aggrecan erreichen. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von NO für den Prozess der Redifferenzierung expandierter artikulärer Chondrozyten auf.

Die Autoren Kim et al. [109] publizierten 2002 Daten, die ebenfalls den Einfluss von NO auf die Differenzierung artikulärer Chondrozyten stützen. Sie behandelten Knorpelzellen mit Nitroprussid-Natrium (direkte NO-Freisetzung) und beobachteten dabei eine Dedifferenzierung der Chondrozyten. Allerdings gründen ihre Ergebnisse nicht auf Untersuchungen an humanen Zellen sondern auf Studien an Gelenkknorpelzellen von Kaninchen.

### 5.3 Fazit

In der vorliegenden Studie wurde die Genexpression humaner artikulärer Chondrozyten während deren Expansion in Monolayerkultur und anschließender Redifferenzierung in Form dreidimensionaler Zellaggregate untersucht.

Neben der Analyse der Genexpression der NOS-Isoformen sowie der Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan wurden dabei funktionelle Zusammenhänge im menschlichen Knorpelgewebe geklärt und regulative Abhängigkeiten auf der Ebene der Transkription identifiziert. In zahlreichen, unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen konnte die Wirkung von NO auf den Metabolismus humaner artikulärer Chondrozyten aufgezeigt werden. Insbesondere gelang es, den Einfluss dieses kurzlebigen Signalmoleküls auf Differenzierungsvorgänge kultivierter Knorpelzellen zu belegen.

Aus den gewonnenen Ergebnissen ergeben sich eine ganze Reihe potentieller Anwendungsmöglichkeiten. Der gezielte Einsatz von NOS-Inhibitoren könnte zu einer Optimierung der *in vitro*-Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die Therapie chondraler und osteochondraler Defekte führen. Ebenso könnte diese Substanzgruppe das Redifferenzierungsverhalten expandierter Chondrozyten *in vivo*, beispielsweise im Rahmen der autologen Transplantation dieser Zellen positiv beeinflussen. Das verbesserte Verständnis der molekularen Mechanismen um den NO-Metabolismus im humanen adulten Knorpelgewebe könnte zudem zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei chronischen Gelenkerkrankungen wie Arthrose und rheumatoider Arthritis beitragen.

## **6 Zusammenfassung**

Bei der Kultivierung humaner artikulärer Chondrozyten für eine mögliche therapeutische Anwendung gilt es, deren besondere zellphysiologische Eigenschaften zu berücksichtigen, um ein zell- und molekularbiologisch hochwertiges Transplantat erzielen zu können.

Stickstoffmonoxid (NO) gilt als ein wichtiger Faktor für die Homöostase der chondrogenen Extrazellulärmatrix, der für die Funktion des hyalinen Gelenkknorpels entscheidenden Gewebekomponente. Es stellt bisherigen Untersuchungen nach einen wichtigen Regulator im sensiblen Gleichgewicht zwischen der Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine und dem Matrixabbau dar. Trotz dieser Bedeutung ist das Wissen über die Expression der NO-generierenden Enzyme in humanen artikulären Chondrozyten, insbesondere unter Kulturbedingungen, sehr begrenzt. Des Weiteren fehlen Erkenntnisse über den Einfluss von NO auf den Differenzierungsstatus dieser Zellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Genexpression adulter Gelenkknorpelzellen während deren Expansion und anschließender Redifferenzierung in einem *in vitro*-Modell. Das Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die 3 NOS-Isoformen sowie die beiden Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan gelegt. In Zusatzversuchen wurde die Bedeutung von NO für den Metabolismus sowie für Differenzierungsvorgänge humaner artikulärer Chondrozyten untersucht. Hierbei sollten funktionelle Zusammenhänge aufgezeigt und regulative Abhängigkeiten auf der Ebene der Transkription identifiziert werden.

Humane artikuläre Chondrozyten wurden hierfür unter standardisierten Bedingungen enzymatisch aus Knorpelgewebe von Femurköpfen isoliert. Nach Expansion der Zellen in zweidimensionaler Monolayerkultur wurden die amplifizierte Zellen in Form dreidimensionaler Zellaggregate in einem chondrogenen Differenzierungsmedium rekultiviert. Veränderungen des zellulären Phänotyps wurden morphologisch, histochemisch, immunhistochemisch und mittels RT-PCR auf Genexpressionsebene verfolgt.

Im Verlauf der Expansion konnte eine funktionelle und morphologische Dedifferenzierung der Chondrozyten dokumentiert werden. Durch 21tägige

Rekultivierung in einem definierten chondrogenen Differenzierungsmedium konnten die Zellen ihre, zuvor verloren gegangenen knorpelspezifischen Eigenschaften wieder ausbilden (Redifferenzierung). Die Analyse der Genexpression der NOS-Isoformen humaner artikulärer Chondrozyten auf RNA-Ebene ergab neben der, in der Literatur bereits beschriebenen induzierbaren NOS die Expression zweier weiterer Isoformen, der neuronalen und der endothelialen NOS.

In weiteren Versuchen wurde der Effekt verschiedener Mediatoren auf die Genexpression der Gelenkknorpelzellen beobachtet. So wurden Zellaggregate während verschiedener Phasen der Redifferenzierung mit rhIL-1 $\beta$  bzw. rhTNF $\alpha$  stimuliert. Die Chondrozyten reagierten darauf mit einer starker Induktion der induzierbaren NOS sowie mit einem konsekutiven Anstieg der NO-Freisetzung. Die eNOS-Expression wurde negativ reguliert. Auf die Konzentration der nNOS-Transkripte hatten beide Zytokine keinen messbaren Einfluss. Zudem konnte auf diesen Reiz hin eine drastische Reduktion der Kollagen Typ II und Aggrecan-Expression festgestellt werden. In Zusatzversuchen, bei denen u.a. ein NO-Donor und ein NOS-Inhibitor zum Einsatz kamen wurde dieser Effekt genauer erforscht. Aus den gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Effekt von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auf die Synthese der beiden wichtigen Matrixproteine Kollagen Typ II und Aggrecan zumindest teilweise über NO vermittelt wird.

In mehren Versuchsreihen gelang es des Weiteren die besondere Bedeutung von NO für die Zelldifferenzierung zu belegen. Die Modifikation des verwendeten chondrogenen Differenzierungsmediums durch Zusatz des NOS-Inhibitors N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin (L-NAA) führte zu einer deutlich früheren bzw. stärkeren Expression der beiden chondrogenen Markergene Kollagen Typ II und Aggrecan.

Die gewonnen Erkenntnisse könnten somit zu einer Optimierung der Anzuchtung humaner artikulärer Chondrozyten für die autologe Transplantation dieser Zellen als auch für deren Verwendung zur Herstellung von Knorpelersatzgewebe *in vitro* beitragen. Das verbesserte Verständnis der molekularen Mechanismen um den NO-Metabolismus im humanen adulten Knorpelgewebe könnte zudem zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei chronischen Gelenkerkrankungen wie Arthrose und rheumatoider Arthritis beitragen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] **T. Aizawa, T. Kon, T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld:** Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha, *J Orthop Res* 19 (2001) 785-796.
- [2] **W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles:** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J* 357 (2001) 593-615.
- [3] **A.R. Amin, S.B. Abramson:** The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol* 10 (1998) 263-268.
- [4] **A.R. Amin, P.E. Di Cesare, et al.:** The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase, *J Exp Med* 182 (1995) 2097-2102.
- [5] **H.C. Anderson, S. Chacko, J. Abbott, H. Holtzer:** The loss of phenotypic traits by differentiated cells *in vitro*. VII. Effects of 5-bromodeoxyuridine and prolonged culturing on fine structure of chondrocytes, *Am J Pathol* 60 (1970) 289-312.
- [6] **K.A. Athanasion, M.P. Rosenwasser, et al.:** Interspecies comparison of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage, *J Orthop Res* 9 (1991) 330-340.
- [7] **T.B. Aufdemorte, W.C. Fox, et al.:** An intraosseous device for studies of bone-healing. The effect of transforming growth-factor beta, *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992) 1153-1161.
- [8] **A.L. Aulthouse, M. Beck, et al.:** Expression of the human chondrocyte phenotype *in vitro*, *In Vitro Cell Dev Biol* 25 (1989) 659-668.
- [9] **A.L. Aulthouse, K. Becker, M. Beck:** Proteoglycan synthesis by cultured human chondrocytes, *Microsc Res Tech* 28 (1994) 520-526.
- [10] **M.B. Aydelotte, K.E. Kuettner:** Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production., *Connect Tissue Res* 18 (1988) 205-222.
- [11] **C. Bassleer, P. Gysen, R. Bassleer, P. Franchimont:** Effects of peptidic glycosaminoglycans complex on human chondrocytes cultivated in three dimensions., *Biochem Pharmacol* 37 (1988) 1939-1945.

- 
- [12] **C. Bassleer, P. Gysen, et al.:** Human chondrocytes in tridimensional culture, *In Vitro Cell Dev Biol* 22 (1986) 113-119.
- [13] **J.S. Beckman:** The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: J. Lancaster (Ed.), *Nitric Oxide: Principles and actions*, Academic Press, San Diego, 1997, pp. 1-82.
- [14] **J.S. Beckman, W.H. Koppenol:** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am J Physiol* 271 (1996) 1424-1437.
- [15] **A. Benninghoff:** Der funktionelle Bau des Hyalinknorpels, *Ergeb Anat Entw Gesch* 26 (1925) 1-54.
- [16] **A. Benninghoff:** Form und Bau der Gelenknorpel in ihrer Beziehung zur Funktion, *Zeitschr Zellforsch* 2 (1925) 783-826.
- [17] **H.P. Benton, J.A. Tyler:** Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I, *Biochem Biophys Res Commun* 154 (1988) 421-428.
- [18] **P.D. Benya, J.D. Shaffer:** Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell* 30 (1982) 215-224.
- [19] **P.D. Benya, J.D. Shaffer, M.E. Nimni:** Flexibility of the chondrocyte collagen phenotype, *Semin Arthritis Rheum* 11 (1981) 44-46.
- [20] **J.M. Bert, K. Maschka:** The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone, *Arthroscopy* 5 (1989) 25-32.
- [21] **M. Bettex-Galland, U. Wiesmann:** Differentiation of L6 myoblastic cells into chondrocytes, *Experientia* 43 (1987) 610-611.
- [22] **F.J. Blanco, R.L. Ochs, H. Schwarz, M. Lotz:** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am J Pathol* 146 (1995) 75-85.
- [23] **J. Bonaventure, N. Kadhom, et al.:** Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads, *Exp Cell Res* 212 (1994) 97-104.
- [24] **W.T. Bourque, M. Gross, B.K. Hall:** Expression of four growth factors during fracture repair, *Int J Dev Biol* 37 (1993) 573-579.

- [25] **D.M. Bradham, W.E. Horton, Jr.:** *In vivo* cartilage formation from growth factor modulated articular chondrocytes, Clin Orthop (1998) 239-249.
- [26] **D.S. Brettt, S.H. Snyder:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger, Neuron 8 (1992) 3-11.
- [27] **M. Brittberg:** Autologous chondrocyte transplatation, Clin Orthop 367 [Suppl] (1999) S147-155.
- [28] **M. Brittberg, A. Lindahl, et al.:** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, N Engl J Med 331 (1994) 889-895.
- [29] **M. Brittberg, L. Peterson, et al.:** Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments, J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 3 (2003) 109-115.
- [30] **P. Bruckner, M. van der Rest:** Structure and function of cartilage collagens, Microsc Res Tech 28 (1994) 378-384.
- [31] **J.A. Buckwalter, H.J. Mankin:** Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation, Instr Course Lect 47 (1998) 487-504.
- [32] **J.A. Buckwalter, H.J. Mankin:** Articular Cartilage: Part I, JBJS 79-A (1997) 600-611.
- [33] **J.A. Buckwalter, H.J. Mankin:** Articular Cartilage: Part II, JBJS 79-A (1997) 612-632.
- [34] **J.A. Buckwalter, J.C. Pita, F.J. Muller, J. Nessler:** Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates, J Orthop Res 12 (1994) 144-148.
- [35] **J.A. Buckwalter, L. Rosenberg:** Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage, Coll Relat Res 3 (1983) 489-504.
- [36] **J.A. Buckwalter, L.C. Rosenberg:** Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chodroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein, J Biol Chem 257 (1982) 9830-9839.

- [37] **J.A. Buckwalter, L.C. Rosenberg, et al.:** Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods of facilitation repair. In: J.W. Ewing (Ed.), Articular cartilage and knee joint function. Basic science and arthroscopy, Bristol-Myers/Zimmer Orthopaedic Symposium, Raven Press, New York, 1990, pp. 19-56.
- [38] **J. Bujia, M. Sittinger, et al.:** [Culture of human cartilage tissue using a perfusion chamber], *Laryngorhinootologie* 73 (1994) 577-580.
- [39] **G.R. Burmester, D. Menche, et al.:** Application of monoclonal antibodies to the characterization of cells eluted from human articular cartilage. Expression of Ia antigens in certain diseases and identification of an 85-kD cell surface molecule accumulated in the pericellular matrix, *Arthritis Rheum* 26 (1983) 1187-1195.
- [40] **M. Cao, A. Westerhausen-Larson, et al.:** Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target, *Biochem J* 324 ( Pt 1) (1997) 305-310.
- [41] **S. Chacko, J. Abbott, et al.:** The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte, *J Exp Med* 130 (1969) 417-442.
- [42] **I.G. Charles, R.M. Palmer, et al.:** Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 11419-11423.
- [43] **N.A. Chartrain, D.A. Geller, et al.:** Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 6765-6772.
- [44] **P. Chomczynski, N. Sacchi:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162 (1987) 156-159.
- [45] **T.M. Cocks, J.A. Angus, et al.:** Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture, *J Cell Physiol* 123 (1985) 310-320.

- [46] **S.D. Cook, D.C. Rueger:** Osteogenic protein-1: biology and applications, *Clin Orthop Relat Res* 324 (1996) 29-38.
- [47] **A.A. Czitrom, S. Keating, et al.:** The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation, *J Bone Joint Surg Am* 72 (1990) 574-581.
- [48] **S. De Luca, D. Heinegard, et al.:** Chemical and physical changes in proteoglycans during development of chick limb bud chondrocytes grown in vitro, *J Biol Chem* 252 (1977) 6600-6608.
- [49] **A.E. Denker, S.B. Nicoll, et al.:** Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1, *Differentiation* 59 (1995) 25-34.
- [50] **K. Deshmukh, B.D. Sawyer:** Synthesis of collagen by chondrocytes in suspension culture: modulation by calcium, 3':5'-cyclic AMP, and prostaglandins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 3864-3868.
- [51] **D. Drenckhahn, P. Kugler:** Systematik der Gewebe - Bindegewebe. In: D. Drenckhahn, W. Zenker (Eds.), *Benninghoff - Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, Vol. 1, Urban & Schwarzenberg, München, 1994, pp. 124-141.
- [52] **K. Elima, E. Vuorio:** Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture, *FEBS Lett* 258 (1989) 195-198.
- [53] **C. Errgelet:** Expandierte Knorpelzellen in der orthopädischen Chirurgie, *Implant* 1 (2001) 5-7.
- [54] **C.H. Evans, M. Stefanovic-Racic, et al.:** Nitric oxide and its role in orthopaedic disease, *Clin Orthop* (1995) 275-294.
- [55] **C.H. Evans, S.C. Watkins, et al.:** Nitric oxide and cartilage metabolism, *Methods Enzymol* 269 (1996) 75-88.
- [56] **D.R. Eyre:** Collagen structure and function in articular cartilage: metabolic changes in the development of osteoarthritis. In: K.E. Kuettner, V.M. Goldberg (Eds.), *Osteoarthritic disorders*, The American Academy of Orthopaedic surgeons, Rosemont, Illinois, 1995, pp. 219-229.

- [57] **D.R. Eyre, J.J. Wu, et al.:** Cartilage-specific collagens. Structural studies. In: K.E. Kuettner, J.G. Schleyerbach, J.G. Peyron, V.C. Hascall (Eds.), Articular cartilage and osteoarthritis, Raven Press, New York, 1992, pp. 199-231.
- [58] **F.M. Faraci, J.E. Brian Jr.:** Nitric oxide and the cerebral circulation, Stroke 25 (1994) 692-703.
- [59] **R.P. Ficat, C. Ficat, et al.:** Spongialization: a new treatment for diseased patellae, Clin Orthop (1979) 74-83.
- [60] **A. Fischer:** A pure strain of cartilage cells *in vitro*, J. Exp. Med. 35 (1922) 379 ff.
- [61] **J.P. Freyer:** Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids, Cancer Research 48 (1988) 2432-2439.
- [62] **R.F. Furchgott, P.D. Cherry, et al.:** Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries, J Cardiovasc Pharmacol 6 Suppl 2 (1984) S336-343.
- [63] **R.F. Furchgott, P.M. Vanhoutte:** Endothelium-derived relaxing and contracting factors, Faseb J 3 (1989) 2007-2018.
- [64] **R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, Nature 288 (1980) 373-376.
- [65] **C. Gaissmaier, K. Weise:** Zellphysiologische Besonderheiten expandierter Knorpelzellen, Implant 1 (2001) 3-5.
- [66] **G.J. Gibson, S.L. Schor, et al.:** Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels, J Cell Biol 93 (1982) 767-774.
- [67] **M.B. Goldring:** Degradation of articular cartilage in culture: regulatory factors. In: J.F.J. Woessner, D.S. Howell (Eds.), Joint Cartilage Degradation: Basic and Clinical Aspects, Marcel Dekker, New York, 1992.
- [68] **M.B. Goldring:** The role of the chondrocyte in osteoarthritis, Arthrit. Rheumat. 43 (2000) 1916-1926.
- [69] **M.B. Goldring, J. Birkhead, et al.:** Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes, J Clin Invest 82 (1988) 2026-2037.

- [70] **M.B. Goldring, K. Fukuo, et al.:** Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes, *J Cell Biochem* 54 (1994) 85-99.
- [71] **M.B. Goldring, S.M. Krane:** Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells, *J Biol Chem* 262 (1987) 16724-16729.
- [72] **P.S. Grabowski, H. Macpherson, et al.:** Nitric oxide production in cells derived from the human joint, *Br J Rheumatol* 35 (1996) 207-212.
- [73] **D.A. Grande, M.I. Pitman, et al.:** The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation, *J Orthop Res* 7 (1989) 208-218.
- [74] **L.C. Green, D.A. Wagner, et al.:** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 126 (1982) 131-138.
- [75] **O.W. Griffith, D.J. Stuehr:** Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism, *Annu Rev Physiol* 57 (1995) 707-736.
- [76] **T.M. Griffith, D.H. Edwards, et al.:** The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor, *Nature* 308 (1984) 645-647.
- [77] **M.B. Grisham, D. Jourd'Heuil, et al.:** Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation, *Am J Physiol* 276 (1999) G315-321.
- [78] **M.B. Grisham, D. Jourd'heuil, et al.:** Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism--implications in DNA damage and mutagenesis, *Aliment Pharmacol Ther* 14 Suppl 1 (2000) 3-9.
- [79] **K. Grundmann, B. Zimmermann, et al.:** Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies, *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 389 (1980) 167-187.
- [80] **Z.W. Guan, D. Kamatani, et al.:** Mechanistic studies on the intramolecular one-electron transfer between the two flavins in the human neuronal nitric-oxide synthase and inducible nitric-oxide synthase flavin domains, *J Biol Chem* 278 (2003) 30859-30868.

- [81] **T.E. Hardingham, A.J. Fosang, et al.:** Aggrecan, the chondroitin/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. In: K.E. Kuettner, J.G. Schleyerbach, J.G. Peyron, V.C. Hascall (Eds.), *Articular cartilage and osteoarthritis*, Raven Press, New York, 1992, pp. 5-20.
- [82] **S. Hashimoto, M. Setareh, et al.:** Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes, *Arthritis Rheum* 40 (1997) 1749-1755.
- [83] **S. Hashimoto, K. Takahashi, et al.:** Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis, *Arthritis Rheum* 41 (1998) 1266-1274.
- [84] **H.J. Hauselmann, L. Oppliger, et al.:** Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture, *FEBS Lett* 352 (1994) 361-364.
- [85] **D. Heinegard, A. Oldberg:** Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules, *Faseb J* 3 (1989) 2042-2051.
- [86] **M.S. Hickery, M.T. Bayliss, et al.:** Age-related changes in the response of human articular cartilage to IL-1alpha and transforming growth factor-beta (TGF-beta): chondrocytes exhibit a diminished sensitivity to TGF-beta, *J Biol Chem* 278 (2003) 53063-53071.
- [87] **M. Higuchi, N. Higashi, et al.:** Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages, *J Immunol* 144 (1990) 1425-1431.
- [88] **H. Holtzer, J. Abbott, et al.:** The loss of phenotypic traits by differentiated cells *in vitro*. I. Dedifferentiation of cartilage cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 46 (1960) 1533-1542.
- [89] **H. Holtzer, S. Chacko, et al.:** Variable behavior of chondrocytes *in vitro*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1970.
- [90] **T. Horstmann:** Sportfähigkeit bei Arthrose und nach endoprothetischer Versorgung, *Sportorthop-Sporttraumat* 16 (2000) 26-29.

- [91] **J.M. Hoskins, G.G. Meynell, et al.:** A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells, *Exp Cell Res* 11 (1956) 297-305.
- [92] **K. Huch, J. Stove, W. Puhl, et al.:** [Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes], *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140 (2002) 145-152.
- [93] **E.B. Hunziker:** Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?, *Osteoarthritis and Cartilage* 7 (1999) 15-28.
- [94] **E.B. Hunziker, L.C. Rosenberg:** Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane, *JBJS Am.* 78 (1996) 721-733.
- [95] **C. Iadecola:** Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury, *Trends Neurosci* 1997 (1997) 132-139.
- [96] **C. Iadecola, F. Zhang, et al.:** Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia, *Stroke* 27 (1996) 1373-1380.
- [97] **L.J. Ignarro:** Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties, *Faseb J* 3 (1989) 31-36.
- [98] **L.J. Ignarro, G.M. Buga, et al.:** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 9265-9269.
- [99] **L.J. Ignarro, R.E. Byrns, et al.:** Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation, *J Pharmacol Exp Ther* 244 (1988) 181-189.
- [100] **T. Ikebe, M. Hirata, et al.:** Effects of human recombinant tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 on the synthesis of glycosaminoglycan and DNA in cultured rat costal chondrocytes, *J Immunol* 140 (1988) 827-831.

- [101] **K. Ishii, B. Chang, et al.:** Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): the endogenous activator of soluble guanylyl cyclase in various types of cells, *J Appl Cardiol* 4 (1989) 505-512.
- [102] **M. Jakob, O. Démarteau, et al.:** Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins, *Rheumatology (Oxford)* 43 (2004) 852-857.
- [103] **S.P. Janssens, A. Shimouchi, et al.:** Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase, *J Biol Chem* 267 (1992) 14519-14522.
- [104] **L.L. Johnson:** Arthroscopic abrasion arthroplasty. In: J.B. McGinty (Ed.), *Operative arthroscopy*, Raven Press, New York, 1991.
- [105] **L.L. Johnson:** The sclerotic lesion: pathology and the clinical response to arthroscopic abrasion arthroplasty. In: J.W. Ewing (Ed.), *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*, Raven Press, New York, 1990, pp. 319-333.
- [106] **L.C. Junqueira, J. Carneiro:** *Histologie*, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 1996.
- [107] **J. Kawiak, S. Moskalewski, et al.:** Isolation of chondrocytes from calf cartilage, *Exp Cell Res* 39 (1965) 59-68.
- [108] **H.A. Kim, Y.W. Song:** Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 42 (1999) 1528-1537.
- [109] **S.-J. Kim, J.-W. Ju, et al.:** ERK-1/2 and p38 Kinase Oppositely Regulate Nitric Oxide-induced Apoptosis of Chondrocytes in Association with p53, Caspase-3, and Differentiation Status, *J Biol Chem* 277 (2002) 1332-1339.
- [110] **T. Kimura, N. Yasui, et al.:** Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures, *Clin Orthop* (1984) 231-239.
- [111] **B.N. King, S.M. Haque, et al.:** Inhibition of neural nitric oxide synthase attenuates the chloride secretory response to stroking in human jejunum, *Surgery* 134 (2003) 255-259.
- [112] **J. Kishimoto, N. Spurr, et al.:** Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12, *Genomics* 14 (1992) 802-804.

- [113] **T. Kruger, D. Wohlrab, et al.:** Results of arthroscopic joint debridement in different stages of chondromalacia of the knee joint, *Arch Orthop Trauma Surg* 120 (2000) 338-342.
- [114] **K.E. Kuettner, V.A. Memoli, et al.:** Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype, *J Cell Biol* 93 (1982) 751-757.
- [115] **K.E. Kuettner, B.U. Pauli, et al.:** Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. I. Isolation, culture characteristics, and morphology, *J Cell Biol* 93 (1982) 743-750.
- [116] **J.M. Lane, C. Weiss:** Review of articular cartilage collagen research, *Arthritis Rheum* 18 (1975) 553-562.
- [117] **H. Leonhardt:** *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Thieme, Stuttgart, 1977.
- [118] **R. Lev, S.S. Spicer:** Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH, *J Histochem Cytochem* 12 (1964) 309-319.
- [119] **A. Lindahl, M. Brittberg, et al.:** Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects, *Novartis Found Symp* 249 (2003) 175-186.
- [120] **F.C. Linn, L. Sokoloff:** Movement and composition of interstitial fluid of cartilage, *Arthrit Rheumat* 8 (1965) 481-494.
- [121] **H. Liu, Y.W. Lee, et al.:** Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads, *Biochim Biophys Acta* 1425 (1998) 505-515.
- [122] **C.H. Lohmann, Z. Schwartz, et al.:** Der Differenzierungsgrad von Chondrozyten und ihre Vorbehandlung mit "platelet-derived-growth-factor", *Orthopäde* 29 (2000) 120-128.
- [123] **M. Lotz, S. Hashimoto, et al.:** Mechanisms of chondrocyte apoptosis, *Osteoarthritis Cartilage* 7 (1999) 389-391.
- [124] **K.L. MacNaul, N.I. Hutchinson:** Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions, *Biochem Biophys Res Commun* 196 (1993) 1330-1334.

- [125] **R. Maier, G. Bilbe, et al.:** Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression, *Biochim Biophys Acta* 1208 (1994) 145-150.
- [126] **C.J. Malemud, R.S. Papay:** The in vitro cell culture age and cell density of articular chondrocytes alter sulfated-proteoglycan biosynthesis, *J Cell Physiol* 121 (1984) 558-568.
- [127] **F. Mallein-Gerin, R. Garrone, et al.:** Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes, *Eur J Cell Biol* 56 (1991) 364-373.
- [128] **F. Mallein-Gerin, F. Ruggiero, et al.:** Proteoglycan core protein and type II collagen gene expressions are not correlated with cell shape changes during low density chondrocyte cultures, *Differentiation* 43 (1990) 204-211.
- [129] **H.J. Mankin, H. Dorfman, et al.:** 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 (1971) 523-537.
- [130] **W.K. Manning, W.M. Bonner:** Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage, *Arthrit Rheumat* 10 (1967) 235-239.
- [131] **S. Marlovits, F. Kutscha-Lissberg, et al.:** Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks, *Radiologe* 44 (2004) 763-772.
- [132] **A. Maroudas, H. Muir, et al.:** The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage, *Biochim Biophys Acta* 177 (1969) 492-500.
- [133] **A.I. Maroudas:** Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage, *Nature* 260 (1976) 808-809.
- [134] **P.A. Marsden, H.H. Heng, et al.:** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J Biol Chem* 268 (1993) 17478-17488.
- [135] **P.A. Marsden, K.T. Schappert, et al.:** Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase, *FEBS Lett.* 307 (1992) 287-293.

- [136] **J. Martel-Pelletier, N. Alaaeddine, et al.:** Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis, *Front Biosci* 4 (1999) D694-703.
- [137] **I. Massova, L.P. Kotra, et al.:** Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification, *FASEB J* 12 (1998) 1075-1095.
- [138] **W.R. Mathews, S.W. Kerr:** Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide, *J Pharmacol Exp Ther* 267 (1993) 1529-1537.
- [139] **R. Mayne, M.S. Vail, et al.:** Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (1976) 1674-1678.
- [140] **C.A. McDevitt, H. Muir:** Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog, *J Bone Joint Surg Br* 58 (1976) 94-101.
- [141] **G. Meachim, R.A. Stockwell:** The matrix. In: M.A.R. Freeman (Ed.), *Adult articular cartilage*, Grune and Stratton, New York, 1973, pp. 1-50.
- [142] **C. Melchiorri, R. Meliconi, et al.:** Enhanced and coordinated *in vivo* expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis, *Arthritis Rheum* 41 (1998) 2165-2174.
- [143] **F. Moldovan, J.P. Pelletier, et al.:** Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage *in situ*: *in vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta, *Arthritis Rheum* 40 (1997) 1653-1661.
- [144] **K. Moore, T.V.N. Persaud:** The developing human clinically oriented embryology, W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovic, Inc., Philadelphia, 1993.
- [145] **S.M. Morris, Jr., T.R. Billiar:** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis, *Am J Physiol* 266 (1994) E829-839.
- [146] **J.B. Moseley, K. O'Malley, et al.:** A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee, *N Engl J Med* 347 (2002) 81-88.
- [147] **V.C. Mow, W.C. Hayes:** Basic orthopaedic biomechanics, Lippencott-Raven, Philadelphia, 1997.

- [148] **V.C. Mow, W.M. Lai:** Mechanics of animal joints, *Ann Rev Fluid Mech* 11 (1979) 247-288.
- [149] **V.C. Mow, M.P. Rosenwasser:** Articular cartilage. Biomechanics. In: S.L.-Y. Woo, J.A. Buckwalter (Eds.), *Injury and repair of musculoskeletal soft tissues*, The American Academy Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Illinois, 1995, pp. 427-463.
- [150] **W. Mueller-Klieser:** Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research, *J Cancer Res Clin Oncol* 113 (1987) 101-122.
- [151] **H. Muir, P. Bullough, et al.:** The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications, *J Bone Joint Surg Br* 52 (1970) 554-563.
- [152] **H.-J. Müller:** PCR - Polymerase-Kettenreaktion, Spektrum, Akad. Verl., Berlin, 2001.
- [153] **K. Mullis, F. Faloona, et al.:** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986, *Biotechnology* 24 (1992) 17-27.
- [154] **K.B. Mullis, F.A. Faloona:** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155 (1987) 335-350.
- [155] **G. Murphy, V. Knauper, et al.:** Matrix metalloproteinases in arthritic disease, *Arthritis Res* 4 Suppl 3 (2002) S39-49.
- [156] **G.A. Murrel, D. Jang, R.J. Williams:** Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage, *Biochem Biophys Res Commun* 206 (1995) 15-21.
- [157] **H. Nagase:** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biol Chem* 378 (1997) 151-160.
- [158] **C. Nathan:** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J* 6 (1992) 3051-3064.
- [159] **D. Nehring, P. Adamietz, et al.:** Perfusion cultures and modelling of oxygen uptake with three-dimensional chondrocyte pellets, *Bio-technology Techniques* 13 (1999) 701-706.
- [160] **C.R. Newton, A. Graham:** PCR, Springer Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997.

- [161] **A.I. Nikolaev, V.I. Dubovaia, et al.:** [Identification of genes induced to chondrocytes by nitric oxide], *Mol Biol (Mosk)* 36 (2002) 833-841.
- [162] **D.P. Norby, C.J. Malemud, et al.:** Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture, *Arthritis Rheum* 20 (1977) 709-716.
- [163] **M.E. Nuttall, D.P. Nadeau, et al.:** Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes *in vitro*, *J Orthop Res* 18 (2000) 356-363.
- [164] **R.D. Oakeshott, I. Farine, et al.:** A clinical and histologic analysis of failed fresh osteochondral allografts, *Clin Orthop* (1988) 283-294.
- [165] **R.M. Palmer, M.S. Hickery, et al.:** Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 193 (1993) 398-405.
- [166] **R.M.J. Palmer, D.S. Ashton, et al.:** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature* 333 (1988) 664-666.
- [167] **R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, et al.:** Nitric oxide accounts for the activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327 (1987) 524-526.
- [168] **J.P. Pelletier, D.V. Jovanovic, et al.:** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis *in vivo*: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level, *Arthritis Rheum* 43 (2000) 1290-1299.
- [169] **J.P. Pelletier, F. Mineau, et al.:** The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation, *Osteoarthritis Cartilage* 4 (1996) 77-84.
- [170] **M.A. Perrella, M. Yoshizumi, et al.:** Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells, *J Biol Chem* 269 (1994) 14595-14600.
- [171] **L. Peterson, M. Brittberg, et al.:** Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability, *Am J Sports Med* 30 (2002) 2-12.
- [172] **L. Peterson, D. Menche:** Chondrocyte transplantation - an experimental model in the rabbit, *Trans Ortho Res Soc* 9 (1984) 218.

- [173] **L. Peterson, T. Minas, et al.:** Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee, *Clin Orthop* (2000) 212-234.
- [174] **A. Petros, D. Bennett, et al.:** Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock, *Lancet* 338 (1991) 1557-1558.
- [175] **D.J. Pinsky, B. Cai, et al.:** The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta, *J Clin Invest* 95 (1995) 677-685.
- [176] **A.R. Poole, L.C. Rosenberg, et al.:** Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage, *J Orthop Res* 14 (1996) 681-689.
- [177] **S. Preis, Erggelet:** Therapie von Knorpelschäden mit Autologer Chondrozytenimplantation (ACI), *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (2003) 225-228.
- [178] **K.H. Pridie:** A method of resurfacing osteoarthritic knee joints, *J Bone Joint Surg Br* 41 (1959) 618-619.
- [179] **D.A. Rappolee, D. Mark, et al.:** Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping, *Science* 241 (1988) 708-712.
- [180] **F. Redini, M. Daireaux, et al.:** Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-b), *Biochim Biophys Acta* 1093 (1991) 196-206.
- [181] **A.M. Reginato, C. Sanz-Rodriguez, et al.:** Transcriptional modulation of cartilage-specific collagen gene expression by interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in cultured human chondrocytes, *Biochem J* 294 ( Pt 3) (1993) 761-769.
- [182] **H. Rixen, G. Dyckhoff, et al.:** [Comparative studies on collagen expression of chondrocytes in monolayer and spheroid culture], *Verh Dtsch Ges Pathol* 74 (1990) 365-367.
- [183] **J.J. Rodrigo, J.R. Steadman, et al.:** Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion., *Am J Knee Surg* 7 (1994) 109-116.

- [184] **F. Rosen, G. McCabe, et al.:** Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation, *Arthritis Rheum* 40 (1997) 1275-1281.
- [185] **L. Rosenberg:** Symposium on dynamics of connective tissue macromolecules, Cambridge, 1974. In: P.M.C. Burleigh, A.R. Poole (Eds.), American Elsevier, New York, 1975.
- [186] **L.C. Rosenberg:** Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. In: K.E. Kuettner, J.G. Schleyerbach, J.G. Peyron, V.C. Hascall (Eds.), *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Raven Press, New York, 1992, pp. 45-63.
- [187] **L.C. Rosenberg, J.A. Buckwalter:** Cartilage proteoglycans. In: K.E. Kuettner, J.G. Schleyerbach, V.C. Hascall (Eds.), *Articular Cartilage Biochemistry*, Raven Press, New York, 1986, pp. 39-57.
- [188] **P.J. Roughley, E.R. Lee:** Cartilage proteoglycans: structure and potential functions, *Micros Res Tech* 28 (1994) 385-397.
- [189] **M. Rudert, C.J. Wirth:** [Cartilage regeneration and substitution], *Orthopade* 27 (1998) W309-321.
- [190] **R.L. Sah, D. Amiel, et al.:** Tissue engineering of articular cartilage, *Curr Opin Orthop* 6 (1995) 52-60.
- [191] **R.K. Saiki, D.H. Gelfand, et al.:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239 (1988) 487-491.
- [192] **J. Sambrook, E.F. Fritsch, et al.:** *Molecular cloning: A laboratory handbook*, Cold spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, 1989.
- [193] **L.J. Sandell:** Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage. In: K.E. Kuettner, V.M. Goldberg (Eds.), *Osteoarthritic disorders*, The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, 1995, pp. 131-146.
- [194] **L.J. Sandell, H. Chansky, et al.:** Molecular biology of cartilage proteoglycans and link protein. In: K.E. Kuettner, V.M. Goldberg (Eds.), *Osteoarthritic*

- disorders, The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, 1995, pp. 131-146.
- [195] **F. Sanger, A.R. Coulson:** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J Mol Biol* 94 (1975) 441-448.
- [196] **N. Schachar, M. Nagao, et al.:** Cryopreserved articular chondrocytes grow in culture, maintain cartilage phenotype, and synthesize matrix components, *J Orthop Res* 7 (1989) 344-351.
- [197] **J.R. Schiltz, R. Mayne, et al.:** The synthesis of collagen and glykosaminoglycans by dedifferentiated chondroblasts in culture, *Dedifferentiation* 1 (1973) 97-108.
- [198] **J.R. Schiltz, S. Ward:** Effects of chick embryo extract fractions on collagen and glycosaminoglycan metabolism by chick chondroblasts, *Biochim Biophys Acta* 628 (1980) 343-354.
- [199] **H.H.H.W. Schmidt:** NO, endogener Botenstoff und Zellgift, *Med Mo Pharm* 17 (1994) 168-176.
- [200] **H.H.H.W. Schmidt, H. Nau, et al.:** Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide, *Eur J Pharmacol* 154 (1988) 213-216.
- [201] **H.H.H.W. Schmidt, U. Walter:** NO at work, *Cell* 78 (1994) 919-925.
- [202] **C.A. Seguin, S.M. Bernier:** TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways., *J Cell Physiol* 197 (2003) 356-369.
- [203] **S.H. Snyder, D.S. Bredt:** Biological roles of nitric oxide, *Sci Am* 266 (1992) 68-71, 74-77.
- [204] **L. Sokoloff:** Articular chondrocytes in culture - matrix production and hormonal effects, *Arthrit Rheumat* 9 (1976) 426-429.
- [205] **L. Sokoloff:** Cell biology and the repair of articular cartilage, *J. Rheum.* 1 (1974) 9-16.
- [206] **N.F. Sprague, 3rd:** Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease, *Clin Orthop* (1981) 118-123.

- [207] **J. Stadler, M. Stefanovic-Racic, et al.:** Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide, *J Immunol* 147 (1991) 3915-3920.
- [208] **J.S. Stamler, D.J. Singel, et al.:** Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms, *Science* 258 (1992) 1898-1902.
- [209] **R.A. Star:** Nitric oxide, *Am J Med Sci* 306 (1993) 348-358.
- [210] **J.R. Steadman, W.G. Rodkey, et al.:** Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes, *J Knee Surg* 15 (2002) 170-176.
- [211] **M. Stefanovic-Racic, T.I. Morales, et al.:** The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures, *J Immunol* 156 (1996) 1213-1220.
- [212] **M. Stefanovic-Racic, J. Stadler, et al.:** Nitric oxide and arthritis, *Arthritis Rheum* 36 (1993) 1036-1044.
- [213] **M. Stefanovic-Racic, D. Taskiran, et al.:** Modulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by endogenously produced nitric oxide, *Inflamm Res* 44 Suppl 2 (1995) S216-217.
- [214] **D.O. Stichtenoth, J.C. Frolich:** Nitric oxide and inflammatory joint diseases, *Br J Rheumatol* 37 (1998) 246-257.
- [215] **Z. Szekanecz, G.K. Haines, et al.:** Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease, *Clin Immunol Immunopathol* 76 (1995) 187-194.
- [216] **D. Taskiran, M. Stefanovic-Racic, et al.:** Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1, *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1994) 142-148.
- [217] **A.Y. Thompson, K.A. Piez, et al.:** Chondrogenesis in agarose gel culture. A model for chondrogenic induction, proliferation and differentiation, *Exp Cell Res* 157 (1985) 483-494.
- [218] **B. Tillmann:** Binde- und Stützgewebe des Bewegungsapparates. In: H. Leonhardt, B. Tillmann, G. Töndury, K. Zilles (Eds.), Rauber, Kopsch:

- Anatomie des Menschen - Lehrbuch und Atlas, Vol. 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998, pp. 13-49.
- [219] **B. Tillmann:** Skelettsystem. In: H. Leonhardt, B. Tillmann, G. Töndury, K. Zilles (Eds.), Rauber, Kopsch: Anatomie des Menschen - Lehrbuch und Atlas, Vol. 1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998, pp. 51-127.
- [220] **J.A. Tyler:** Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin 1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules, *Biochem J* 227 (1985) 869-878.
- [221] **J.A. Tyler, H.P. Benton:** Synthesis of type II collagen is decreased in cartilage cultured with interleukin 1 while the rate of intracellular degradation remains unchanged, *Coll Relat Res* 8 (1988) 393-405.
- [222] **R.J. van't Hof, L. Hocking, et al.:** Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint, *Rheumatology (Oxford)* 39 (2000) 1004-1008.
- [223] **K. von der Mark, G. Conrad:** Cartilage cell differentiation: review, *Clin Orthop* (1979) 185-205.
- [224] **K. von der Mark, V. Gauss, et al.:** Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture, *Nature* 267 (1977) 531-532.
- [225] **J.L. Vuletich, E.R. Lowe, et al.:** Alteration of the heme prosthetic group of neuronal nitric-oxide synthase during inactivation by N(G)-amino-L-arginine *in vitro* and *in vivo*, *Mol Pharmacol* 62 (2002) 110-118.
- [226] **G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, et al.:** Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage, *J Orthop Res* 17 (1999) 130-138.
- [227] **K. Vuolteenaho, T. Moilanen, et al.:** Regulation of the nitric oxide production resulting from the glucocorticoid-insensitive expression of iNOS in human osteoarthritic cartilage, *Osteoarthritis Cartilage* 9 (2001) 597-605.
- [228] **H. Wagner:** Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation, *Z Orthop* 110 (1972) 708-715.

- [229] **K. Weise:** Die operative Behandlung von Gelenkknorpeldefekten unter besonderer Berücksichtigung der autologen Knorpelzelltransplantation: Grundlage - Ergebnisse - Ausblick, *OP-Journal* 16 (2000) 150-159.
- [230] **B. Wilbrink, J.J. Nietfeld, et al.:** Role of TNF alpha, in relation to IL-1 and IL-6 in the proteoglycan turnover of human articular cartilage, *Br J Rheumatol* 30 (1991) 265-271.
- [231] **D.J. Wolff, A. Lubeskie:** Inactivation of nitric oxide synthase isoforms by diaminoguanidine and NG-amino-L-arginine, *Arch Biochem Biophys* 325 (1996) 227-234.
- [232] **I. Yaron, F.A. Meyer, et al.:** Some recombinant human cytokines stimulate glycosaminoglycan synthesis in human synovial fibroblast cultures and inhibit it in human articular cartilage cultures, *Arthritis Rheum* 32 (1989) 173-180.
- [233] **N. Yasui, S. Osawa, et al.:** Primary culture of chondrocytes embedded in collagen gels, *Exp Cell Biol* 50 (1982) 92-100.

**8. Abkürzungsverzeichnis**

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet. Aminosäuren und Nukleotide sind im Einbuchstabencode dargestellt.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
atm	Atmosphären
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCD	„Charge Coupled Device“
CD	„cluster of differentiation“ (Zelloberflächenantigene)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Dideoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

EDRF	“endothelium-derived relaxing factor”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NOS ; NOS Typ III; NOS-3
et al.	und andere (lat.)
FAD	Flavin-Adenindinukleotid
FCS	“fetal calf serum”
FMN	Flavin-Mononukleotid
g (x g)	Erdbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase
IDDM	“insulin dependent diabetes mellitus“
Ig	Immunglobulin
IL-1 $\beta$	Interleukin 1-beta
iNOS	induzierbare NOS; NOS Typ II; NOS-2
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
kDa	1000 Dalton (1 Dalton = $1,6605 \times 10^{-24}$ g)
M	molar
max.	maximal
Min.	Minute(n)
MMLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-RNA)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nNOS	neuronale NOS; NOS Typ I; NOS-1
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	„optical density“ (optische Dichte)
PBS	Phosphat Saline Puffer
PC	Personalcomputer

PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
RG	Reaktionsgefäß
rhIL-1 $\beta$	Rekombinantes humanes Interleukin 1-beta
rhTGF- $\beta$ 1	Rekombinanter humaner transformierender Wachstumsfaktor-beta1
rhTNF $\alpha$	Rekombinanter humaner Tumor-Nekrosefaktor-alpha
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTase	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
Sek.	Sekunde
sGC	“soluble guanylate cyclase” (lösliche Guanylatcyclase)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U, Unit	Maß für die katalytische Aktivität bei Enzymen
UV	Ultraviolett
V	Volt
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
♀	weiblich
♂	männlich

**Diese Arbeit wurde in Teilen publiziert:**

**Vortrag und Kongressbeitrag**

Gloger H., Heintel T., Schütze N., Weckbach A.

Schnellere Redifferenzierung von kultivierten Chondrozyten durch Beeinflussung des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2003

Heintel T., Schütze N., Weckbach A.

Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Genexpression humaner artikulärer Chondrozyten während Expansion und Redifferenzierung in einem in vitro-Modell

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin 2006

**Poster und Kongressbeitrag**

Heintel T., Gloger H., Schütze N., Weckbach A.

Influence on the synthesis of extracellular matrix by varying the nitric oxide metabolism

Cytotherapy 2004; 6: 300-301;

Strategies in Tissue Engineering 2004 Würzburg

Gloger H., Heintel T., Schütze N., Weckbach A.

Detection of the eNOS in differentiated human chondrocytes

Acta Orthop Scand (Suppl 304) 2002; 73: 37-38;

4<sup>th</sup> Baltic Bone and Cartilage Conference 2003 Binz/Rügen

**Poster**

Gloger H., T. Heintel, N. Schuetze, A. Thiede, A. Weckbach

Nachweis der endothelialen Stickoxid-Synthase (eNOS) in differenzierten humanen Chondrocyten

6. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Köln  
November 2002

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas sowie die allzeit gewährte Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich **Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Weckbach**, Leiter der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie (Chirurgische Klinik II) der Universität Würzburg. Seinem Interesse und seiner Gesprächsbereitschaft ist der Fortgang und Abschluss dieser Arbeit zu verdanken.

Besonderer Dank gebührt **Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze**, Leiter des Labors für Molekulare Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg, für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes, die stetige unkomplizierte, wissenschaftlich anregende Beratung, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für die Übernahme des Koreferates.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor für Molekulare Experimentelle Orthopädie zur praktischen Durchführung dieser Arbeit sowie für die hervorragende Kooperation bin ich **Herrn Prof. Dr. med. Jochen Eulert**, Ärztlicher Direktor der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg zu Dank verpflichtet.

**Herrn Dr. med. Harald Gloger** danke ich für die fachliche Betreuung insbesondere zu Beginn der Arbeit. Es fehlte ihm nie an aufmunternden Worten und er fand jederzeit trotz beruflicher Verpflichtungen einen Termin, um anstehende Fragen und Probleme zu klären.

Für die Einführung in die verschiedenen Methoden danke ich den MTAs des Labors für Molekulare Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg, insbesondere **Jutta Müller** und **Jutta Schneidereit**.

## Danksagung

---

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern **Renate und Karlheinz Heintel**, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung das Studium der Humanmedizin und diese Promotion erst ermöglichten.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Timo Michael Heintel  
Geburtsdaten: 21.03.1976 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

09/1982 – 11/1983      Grundschule Gerbrunn  
11/1983 – 07/1986      Grundschule Uettingen  
09/1986 – 06/1995      Deutschhaus-Gymnasium Würzburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst**

07/1995 – 09/1996      Zivildienst im Bereich Krankentransport/Rettungsdienst  
beim Malteser Hilfsdienst in Würzburg

### **Studium**

10/1998 – 05/2005      Studium der Humanmedizin an der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Abschluss mit der Gesamtnote „sehr gut“  
09/2000      Ärztliche Vorprüfung  
08/2001      Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/2003      Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
05/2005      Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## Lebenslauf

---

### **Famulaturen**

- 02/2001 – 04/2001 Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der  
Universität Würzburg
- 09/2001 – 10/2001 Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungs-  
chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
- 09/2002 – 10/2002 Praxis Dr. med. Michael Gröger, Chirurg, D-Arzt,  
Belegarzt der Theresienklinik Würzburg
- 02/2003 – 03/2003 Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und  
orthopädische Chirurgie, Hanse-Klinikum Stralsund,  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität  
Greifswald

### **Praktisches Jahr**

- 04/2004 – 08/2004 Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der Universität  
Würzburg
- 08/2004 – 12/2004 Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
- 12/2004 – 03/2005 Medizinische Klinik I der Universität Würzburg

### **Berufliche Erfahrungen**

- 10/1996 – 10/1998 Anstellung als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst  
in Würzburg
- 11/1998 – 06/2005 Teilzeitbeschäftigung in gleicher Position beim  
Malteser Hilfsdienst in Würzburg
- Seit 07/2005 Weiterbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie und  
Orthopädie an der Klinik für Unfallchirurgie (Chirurgische  
Klinik II) der Universität Würzburg

