

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

Wirkung von WISP-3 auf dedifferenzierte Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Ruoff

aus Stuttgart

Würzburg, Mai 2019

Referent : Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 25.11.2019

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Degenerative Gelenkerkrankungen (Arthrosen)	1
1.1.1	Pathogenese und Klinik.....	1
1.1.2	Therapie.....	2
1.2	Knorpel und Gelenke	6
1.2.1	Überblick.....	6
1.2.2	Aufbau und Struktur.....	7
1.2.2.1	Zellen.....	8
1.2.2.2	Matrix	8
1.2.2.3	Collagen	8
1.2.2.4	Proteoglykane.....	9
1.2.3	Entwicklung und Wachstum	10
1.2.4	Knorpelarten.....	11
1.2.4.1	Hyaliner Knorpel.....	11
1.2.4.2	Elastischer Knorpel	13
1.2.4.3	Faserknorpel	14
1.2.5	Arthrotische Degeneration	15
1.3	Progressive pseudorheumatoide Dysplasie (PPD)	16
1.3.1	Klinik und Pathogenese.....	16
1.3.2	Histologie und Labor.....	17
1.3.3	Differentialdiagnosen, Therapie und Prognose.....	17
1.4	Die CCN-Familie	18
1.4.2	Die einzelnen Proteine	20
1.4.2.1	CYR61/CCN1	20
1.4.2.2	CTGF/CCN2	21
1.4.2.3	NOV/CCN3.....	22
1.4.2.4	WISP-1/CCN4.....	22
1.4.2.5	WISP-2/CCN5.....	22
1.4.2.6	WISP-3/CCN6.....	22
1.5	Dedifferenzierte Chondrozyten	23
1.6	Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	24
1.7	Ziel der Arbeit	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Herkunft der Zellen	27
2.2	Zellkultur	27
2.2.1	Monolayer-Zellkultur	27
2.2.2	Zellzählung – „dye-exclusion-test“	28
2.2.3	Pellet-Kultur	29
2.3	Histologie	30
2.3.1	Paraffineinbettung von Zellpellets	30
2.3.1.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (4% in PBS)	30
2.3.1.2	Paraffinieren	30
2.3.1.3	Einbettung	30
2.3.2	Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung	31
2.3.2.1	Herstellung von Paraffinschnitten	31
2.3.2.2	Entparaffinieren von Paraffinschnitten	31
2.3.3	H&E-Färbung.....	31

2.3.4 Alcian-Blau-Färbung.....	32
2.3.5 Immunhistochemie – Collagen Typ II-Antikörper-Färbung.....	32
2.3.5.1 Detektion der Bindung des primären Antikörpers (Immunzytochemische Färbung)	33
2.3.6 Apoptose-Färbung	34
2.4 Protein-Analytik	35
2.4.1 Proteinreinigung mit Fc-Tag aus Baculovirus-infizierten Sf21-Zellen – Aufreinigung von WISP3.....	35
2.4.2 Mikro-Bradford-Bestimmung – Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.5 Molekularbiologie	37
2.5.1 RNA-Isolierung	37
2.5.2 cDNA-Synthese.....	39
2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese	41
3 Ergebnisse	44
3.1 Dedifferenzierte Chondrozyten	44
3.1.1 Histologie	44
3.1.2 Immunhistochemie	48
3.1.3 Apoptose-Färbung	51
3.1.4 PCR	52
3.1.4.1 Aggrecan	52
3.1.4.2 Collagen II.....	55
3.2 Mesenchymale Stammzellen.....	57
3.2.1 Histologie	57
3.2.2 Immunhistochemie	57
3.2.3 PCR	58
4 Diskussion	60
5 Zusammenfassung	64
6 Literatur.....	65
7 Abbildungen	78
Curriculum Vitae.....	79

1 Einleitung

1.1 Degenerative Gelenkerkrankungen (Arthrosen)

1.1.1 Pathogenese und Klinik

Die häufigsten Gelenkerkrankungen sind die degenerativen Gelenkerkrankungen, welche für den Patienten schmerzhaft sind und ihn im täglichen Leben einschränken. Mit zunehmendem Alter steigt die Häufigkeit, so dass die Mehrzahl der Menschen über 65 an einer Arthrose leidet, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind.^{46,75,81} Degenerative Gelenkerkrankungen entstehen durch ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit des Gelenkknorpels. Die Ursache kann sowohl auf der biologischen als auch auf der mechanischen Seite liegen. Bei primären Arthrosen liegt eine idiopathische Minderwertigkeit des Knorpelgewebes vor. Sekundäre Arthrosen können sich auf dem Boden von metabolischen Störungen, Fehlbelastungen, Traumata, Entzündungen oder auch altersbedingt entwickeln.^{55,75} Arthrosen verlaufen langsam progredient. Am Anfang steht der Elastizitätsverlust des Gelenkknorpels mit Veränderung der Knorpelgrundsubstanz und Demaskierung kollagener Fasern. Erste röntgenmorphologische Veränderungen zeigen sich in der Höhenabnahme des Knorpelgewebes, der Spaltbildung im Gelenkknorpel und der subchondralen Sklerosierung der Gelenkfläche. Im Spätstadium kommt es zur Auffaserung des Knorpels. Dies führt zum Knorpelabbau, zu Osteophytenbildung am Gelenkrand und zur Bildung von „Geröllzysten“ durch fokale Knochennekrosen.^{46,75} Die Symptome sind durch einen schleichenden Beginn und wechselnden Verlauf gekennzeichnet. Die Hauptsymptome sind Schmerz, Schwellung, Muskelverspannung, Bewegungseinschränkungen und zunehmende Deformität. Zu Beginn der Erkrankung stehen belastungsabhängige Schmerzen und Muskelverspannungen im Vordergrund. Im zweiten Stadium der Arthrose kommt es zum Bewegungsschmerz. Ein bei passiver Bewegung auftretender Schmerz deutet auf das Gelenk selbst hin (Kapselmuster), während der bei aktiver Bewegung auftretende Schmerz aus der Muskulatur und den Sehneninsertionen stammt. Im dritten Stadium der Arthrose ist der Ruheschmerz typisch. Die Deformierung der Gelenkkörper kann zu Achsenfehlstellungen und Instabilität des Gelenkes mit begleitender Muskelatrophie führen.^{55,75}

1.1.2 Therapie

Bisher existieren nur symptomatische Therapieansätze, die auch nicht ausreichend sind. Ziel der Therapie sind Schmerzreduktion, Erhalt der Mobilität sowie das Verhindern des Fortschreitens der Erkrankung. Eine kausale Therapie ist bisher nicht bekannt, man kann nur symptomatisch behandeln.^{75,65}

Heutzutage gibt es in der Therapie der Arthrose sowohl konservative als auch operative Therapieansätze. In der konservativen Therapie wird sowohl nicht-medikamentös als auch medikamentös behandelt. Grundsätzlich sind in der nicht-medikamentösen Therapie eine Entlastung der betroffenen Gelenke zum Beispiel durch Gewichtsreduktion (v.a. bei Gonarthrose) und Physiotherapie und die Unterstützung des Patienten durch entsprechende Führung und Begleitung sinnvoll. Des Weiteren können orthopädische Hilfsmittel und nicht-medikamentöse Formen der Schmerztherapie eingesetzt werden. Hier steht zum Beispiel die Akupunktur als Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) zur Verfügung, die vor allem in der Behandlung von chronischen Knieschmerzen eine signifikante Überlegenheit gegenüber Sham-Akupunktur und gegenüber dem Verzicht auf Akupunktur gezeigt hat. Andererseits hatte die Akupunktur bei Coxarthrose keinen Einfluss auf Schmerz oder Funktionalität.^{103,70} Weitere nicht-medikamentöse Therapieansätze stehen mit Magnetfeldtherapie, Sauerstofftherapie oder Stoßwellenbehandlung zur Verfügung.^{46,75,65,79}

In der medikamentösen Therapie der Arthrose werden dem Arzt und dem Patienten vielfältige Produkte und Medikamente aus den verschiedensten Formenkreisen angeboten. Mittel der ersten Wahl ist zum Beispiel Paracetamol, das gut analgetisch wirkt und auf Grund seines niedrigen Nebenwirkungs- und Wechselwirkungsprofil bei vielen Patienten angewendet werden kann. Eine sehr häufig eingesetzte Medikamentengruppe stellen die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) dar. NSAR vermindern durch Hemmung der Cyclooxygenase die Prostaglandinsynthese und haben damit sowohl analgetische (schmerzstillende), antipyretische (fiebersenkende) als auch antiphlogistische (entzündungshemmende) Wirkqualitäten. Die Cyclooxygenase führt zur Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Prostaglandine haben zahlreiche Wirkungen, die sich auch gegenseitig beeinflussen können. Sie führen unter anderem zu Thrombozytenaggregation und Hemmung der Aggregation, zu Vasokonstriktion und

–dilatation, zu Hyperalgesie, Bronchodilatation, Exsudation und Zytrotektion des Magen-Darm-Trakts. Durch die zahlreichen Wirkungen der Prostaglandine erklären sich auch die zahlreichen Nebenwirkungen der Prostaglandinsynthesehemmer wie z.B. Magengeschwüre, Ödembildung, Kopfschmerzen oder Bronchokonstriktion („Aspirin-Asthma“). Diese Nebenwirkungen können die Anwendbarkeit bei verschiedenen Patientengruppen einschränken.

Eine weitere schmerzlindernde und entzündungshemmende Medikamentengruppe steht mit den Kortikoiden zur Verfügung. Sie werden bis zu 4 Mal pro Jahr intraartikulär verabreicht. Kortikoide haben ein breites Wirkspektrum und daher auch zahlreiche Nebenwirkungen. So bergen sie u.a. die Gefahr von Osteoporose, einer erhöhten Infektneigung, von Ulcusperforation ohne Symptomatik oder von Fettumverteilung.

Patienten, deren Schmerzsymptomatik mit Paracetamol und NSAR nicht ausreichend therapierbar ist oder die diese auf Grund von gastrointestinalen oder renalen Erkrankungen nicht tolerieren, kann die medikamentöse Therapie mittels Opioiden angeboten werden. Opioide sind natürliche oder synthetische Substanzen mit morphinartigen Eigenschaften. Morphin ist eine Substanz, die chemisch vom Opium, das aus den Kapseln des Schlafmohns gewonnen wird, abstammt. Opioide wirken analgetisch und sedierend und haben auch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil. Sie können u.a. zu Obstipation, Hirndruckanstieg, Atemdepression und Abhängigkeit führen.^{51,46,75,65}

Arthrose-Patienten werden eine Vielzahl an Nahrungsergänzungsmitteln angepriesen. Ein Drittel der Patienten hat auch schon ein Nahrungsergänzungsmittel versucht, um den Gesundheitszustand zu verbessern. Die am häufigsten von Arthrose-Patienten genutzten Produkte sind Glucosaminhaltige Nahrungsergänzungsmittel. Nicht alle Studien stimmen miteinander überein, doch die meisten zeigen, dass Glucosaminsulfat Arthrose-assoziierten Schmerz lindern kann. Außerdem scheint es den Krankheitsprogress bei Gonarthrose zu verzögern. Ein weiteres Nahrungsergänzungsmittel ist Chondroitinsulfat, das ebenfalls Arthrose-Symptome verringern soll. Chondroitinsulfat wird oft in Kombination mit Glucosaminsulfat verabreicht. Es gibt allerdings keine verlässlichen Belege dafür, dass die Kombination effektiver sein soll als die alleinige Gabe.⁴² Chondroitinsulfat und Glucosaminsulfat haben weniger Nebenwirkungen als NSAR.³⁵ Ein weiteres Nahrungsergänzungsmittel

ist S-Adenosylmethionin. Es kann Schmerzen reduzieren, doch hohe Kosten und Probleme bei der Qualitätssicherung engen die Einsatzmöglichkeiten ein. Es gibt noch eine Reihe anderer Nahrungsergänzungsmittel, die zur Behandlung der Arthrose angeboten werden, wie z.B. Methylsulfonylmethan, Harpagophytum procumbens (Teufelskralle), Curcuma longa (Gelbwurz) oder Zingiber officinale (Ingwer), aber es sind keine verlässlichen Daten bezüglich der Wirksamkeit oder der Sicherheit vorhanden.⁴²

Auch pflanzliche Medizin kann prinzipiell eine positive Wirkung bei Arthrose-Schmerz zeigen. ASU (avocado/soybean unsaponifiables) können schmerzlindernd wirken und die Einnahmefrequenz von NSAR reduzieren. Außerdem haben sie keine schweren Nebenwirkungen.^{66,70} Diacerein wurde in mehreren Studien untersucht. Es zeigte sich, dass Diacerein den abnormen Knochenstoffwechsel bei Arthrose-Erkrankten durch die Minderung der Osteoklasten-Bildung beeinflussen kann¹⁶. Außerdem scheint es die röntgenologische Progression der Arthrose zu verlangsamen⁷⁰. Andererseits scheint es die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren in Synoviozyten nicht zu senken, sondern eher noch zu erhöhen⁴.

Da die konservativen Behandlungsmethoden allein nicht immer Beschwerdefreiheit verschaffen oder den Progress der Erkrankung verzögern, werden häufig auch operative Behandlungen in Betracht gezogen. So werden zum Beispiel Umstellungsosteotomien zur Verbesserung der Gelenkmechanik durchgeführt, welche Gelenkkongruenz bessern und die Gelenkbelastung vermindern sollen. Des Weiteren gibt es Eingriffe, die eine Verbesserung der Gelenkbiologie versprechen. Durch Knochenanbohrungen kann die Gelenkdurchblutung verbessert werden und die Gelenktrophik durch Synovialektomien. Um die Schmerzhaftigkeit zu reduzieren, können sogar Denervierungen durchgeführt werden. Auf ein Verfahren zur Verbesserung der Gelenkbiologie, insbesondere der Gleitfähigkeit, soll hier verstärkt eingegangen werden. Die autologe Chondrozytentransplantation wird bei Patienten mit symptomatischen Knorpeldefekten mit dem Ziel durchgeführt, den Knorpel zu regenerieren. Im Rahmen einer Arthroskopie wird ein reiskorngroßes Stück Knorpel an einer nicht Gewicht tragenden Gelenkstelle entnommen (meistens an der lateralen Seite des Kniegelenks). Im Labor werden Knorpelzellen von der extrazellulären Matrix separiert und dann, zusammen mit 300-500g schweren Knorpelteilen, in ein Medium, das Antibiotika,

Antimykotika und Ascorbat enthält, überführt. Die Chondrozyten werden durch enzymatischen Verdau isoliert. Sie werden dann unter sterilen Bedingungen im autologen Serum des Patienten für die nächsten 14-21 Tage inkubiert. Es folgen die mehrmalige Testung des Kulturmediums und die chondrogene Phänotypisierung der Zellen. Die vervielfältigten Chondrozyten werden abgelöst, gezählt und in ein für die Implantation geeignetes Medium überführt. Während der Operation injiziert der Chirurg das Zell-Implantat unter das Periost oder eine ähnliche biologische Membran, die den Defekt deckt. Mit aktiver Gelenkbewegung wird nach 2-3 Tagen begonnen, gefolgt von voller Gewichtsbelastung in den nächsten Wochen. Nach einem Jahr soll die volle physische Belastbarkeit wieder gegeben sein.¹⁰⁰

Doch auch die autologe Chondrozytentransplantation ist nicht komplikationslos. Häufige Komplikationen, die in postoperativen MR-Bildgebungen beobachtet wurden, stellen z.B. Hypertrophie des Periosts, Knochenmarksödeme und inkomplette Regeneration des subchondralen Knochens im Operationsgebiet dar.⁷¹ Außerdem wurde von tiefen Infektionen und schmerzhaften intraartikulären Blutungen berichtet.⁸

Weitere operative Eingriffe in der Therapie der Arthrose sind zum Beispiel Gelenkversteifungen (Arthrodesen), die v.a. im Bereich des Fußes, des Sprunggelenks, der oberen Extremitätengelenke und der Wirbelsäule durchgeführt werden oder auch die Autologe Knochen-Knorpel-Transplantation (OATS). Die autologe Knochen-Knorpel-Transplantation (OATS) eignet sich besonders zur Versorgung fokaler tiefgreifender Knorpelschäden oder auch der Osteochondrosis dissecans. Prinzip ist die Entnahme eines Spenderzylinders aus wenig belasteten Bereichen des Kniegelenks in der lateralen oder medialen Trochlea und dessen Transfer in die Defektzone. Eine sichere ossäre Einheilung der Zylinder konnte gezeigt werden, wenngleich eine Integration des Spenderknorpels in die Empfängerumgebung ausbleibt und in einigen Fällen eine Degeneration des hyalinen Knorpels gefunden werden kann.¹⁹

Aber die bei weitem häufigste Operation in der Arthrose-Therapie ist der Ersatz des Hüftgelenks durch eine Endoprothese und soll deshalb beispielhaft vorgestellt werden. Dabei werden in der Regel sowohl das Azetabulum als auch der Femurkopf ersetzt. Der Prothesenstiel kann im Femur mit Knochenzement, einer selbsthärtenden Plastikmasse, verankert werden. Alternativ werden zementfreie Prothesenstiele verwendet, die eine mikroporöse oder makroporöse Oberfläche haben, in die der Knochen einwachsen

kann. Generell wird beim jüngeren Patienten (<60J.) die zementfreie Variante bevorzugt. Die Hüftpfanne wird häufiger zementfrei implantiert. Die Prothesen bestehen meist aus Stahl und Keramik.¹⁰⁷ Auch die Totalendoprothese ist nicht komplikationsfrei. Bei Keramik-Polyethylen-haltigen Hüft-TEPs zeigten sich Osteolysen, Lockerung, Dislokation und Versagen der Komponententeile.⁷⁴ Eine seltene, aber potentiell verheerende Komplikation der Hüft-TEP stellen Nervenverletzungen dar, verursacht z.B. durch Zementextravasation, postoperative Hämatombildung oder Lagerungsfehler.²² Bei Knie-TEPs kam es zu arteriellen Komplikationen wie arteriellen Thrombosen, arteriellen Verschlüssen, arteriovenösen Fisteln, arteriellen Aneurysmata, Pseudoaneurysmata und Abbrüchen der Arterie.^{11,83} Weitere gefürchtete Komplikationen sind Hautnekrosen und Subluxationen der Prothese, die allerdings eher bei Patienten mit rheumatoider Arthritis als bei Arthrose-Patienten auftreten.¹⁷ Ein weiteres Risiko stellen periprotetische Infektionen nach TEP dar. Die häufigsten Erreger sind gram-positive Bakterien. Doch auch Infektionen mit ungewöhnlichen Erregern wie *Mycobacterium fortuitum* wurden beschrieben.⁸⁰ Bei bilateralen und Revisions-TEPs zeigten sich auch kardiovaskuläre intraoperative Komplikationen wie Myokardinfarkte, Arrhythmien oder Lungenembolien.⁹ Da in den frühen Stadien der Erkrankung eine verstärkte Zellproliferation und Synthese von Matrixproteinen, Proteinase, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderer inflammatorischer Mediatoren durch Chondrozyten nachgewiesen werden konnte, konzentriert sich die Forschung nun auf die Chondrozyten als zellulären Mediator der Pathogenese und als möglichen Angriffspunkt für therapeutische Interventionen.^{40,41}

1.2 Knorpel und Gelenke

1.2.1 Überblick

Gelenke sind Kontaktstellen zwischen Skeletteilen, in denen die Skeletteile gegeneinander bewegt werden. Ein Gelenk besteht aus den Oberflächen der miteinander in Kontakt tretenden Skeletteile und den Gewebeelementen, die dazwischen liegen.

Es gibt zwei Arten von Gelenken, die Synarthrosen und die Diarthrosen. Diarthrosen sind diskontinuierliche Gelenke, deren Gelenkflächen durch einen Gelenkspalt

voneinander getrennt sind. Im Gelenkspalt befindet sich Synovialflüssigkeit. Synarthrosen haben keinen Gelenkspalt. Als Verbindung fungiert straffes Bindegewebe oder Knorpel.¹⁴ Das Knorpelgewebe bildet zusammen mit dem Knochengewebe das Stützgewebe des Körpers. Es ist durch einen hohen Gehalt an extrazellulärer Matrix (Knorpelgrundsubstanz) gekennzeichnet, die von den Knorpelzellen (Chondrozyten) sezerniert wird. Dadurch mauern sich die Zellen in Matrix ein und sind dort in Zellhöhlen (Lakunen) gelegen. Knorpelgewebe tritt in nicht-mineralisierter Form bzw. mineralisierter Form auf. Demnach ist es verform- und schneidbar bzw. knochenhart. Knorpelgewebe ist vor allem dort vorhanden, wo sowohl Festigkeit als auch mäßige Verformbarkeit erforderlich sind, z.B. Knorpel in der Wand der Atemwege, Ohrknorpel, Zwischenwirbel und Gelenkscheiben. Die Bedeckung von Gelenkflächen mit Knorpel erlaubt die Übertragung großer Druckkräfte bei minimalem Reibungsverlust.

Knorpelgewebe tritt als hyaliner Knorpel, Faserknorpel und elastischer Knorpel in Erscheinung. Die drei Knorpelformen unterscheiden sich hauptsächlich durch Gehalt und Zusammensetzung der Faserkomponenten der Matrix voneinander.^{13,85}

1.2.2 Aufbau und Struktur

Knorpelgewebe baut sich wie folgt auf:

- Chondrozyten: rundliche, teilweise abgeplattete Knorpelzellen. Sie liegen einzeln oder gruppiert in Lakunen (Höhlen) aus Knorpelgrundsubstanz.
- Knorpelkapsel: Wandung der Lakunen, die besonders stark anfärbbar ist.
- Zellhof oder Knorpelhof: unterschiedlich weiter Hof um die Knorpelkapsel mit spezieller Zusammensetzung der Grundsubstanz

Diese drei Komponenten bilden zusammen ein Chondron bzw. Territorium.

Der Bereich zwischen den einzelnen Chondronen, das Interterritorium, besteht aus der zellfreien Knorpelgrundsubstanz, in die je nach Knorpelart unterschiedliche Fasern eingebaut sind. Die Matrix besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen (v.a. Aggrecan), Collagenfibrillen aus Typ-II-Collagen und Hyaluronsäure. Abgesehen vom Gelenkknorpel ist jeder Knorpel von einer bindegewebigen Knorpelhaut, dem Perichondrium, umhüllt. Das Perichondrium enthält Gefäße und Nerven. Knorpelgewebe selbst ist in der Regel frei von Gefäßen, Nerven und Lymphbahnen und

wird durch Diffusion aus dem Perichondrium oder der Synovialflüssigkeit ernährt.^{10,13,85}

1.2.2.1 Zellen

Die Zellen des Knorpelgewebes sind Chondroblasten (teilungsfähige Knorpelzellen) und Chondrozyten (postmitotische Knorpelzellen). Sie liegen in matrixfreien Knorpelzellohöfen, die sie ohne Randspalt vollkommen ausfüllen. Chondrozyten und Chondroblasten sezernieren große Mengen von Knorpelmatrix und sind entsprechend mit stark entwickeltem rauem ER und Golgi-Apparat sowie zahlreichen Sekretvesikeln ausgestattet. Außerdem enthalten sie viele Mitochondrien und sind glykogenreich.

Chondrozyten synthetisieren nicht nur alle Matrixkomponenten, sondern steuern auch ihren Abbau durch Sekretion verschiedener Metalloproteinasen, Endozytose und lysosomale Degradation. Die Halbwertszeit von Collagen Typ II beträgt ca. 100 Tage im wachsenden und mehrere Jahre im adulten Knorpel des Menschen, während das Hauptproteoglykan (Aggrecan) eine Halbwertszeit von wenigen Tagen bis Wochen besitzt.^{13,85}

1.2.2.2 Matrix

Die Knorpelmatrix ist basophil und lässt sich durch kationische Farbstoffe, wie Methylenblau und Hämatoxylin, gut anfärben. Die Knorpelkapsel ist wegen ihres hohen Gehalts an dem Proteoglykan Aggrecan besonders gut anfärbbar. Aber auch die angrenzenden territorialen Abschnitte sind basophiler als die Interterritorien, sodass das Bild basophiler Knorpelhöfe im Umfeld der Chondrone entsteht. Die Matrix des hyalinen Knorpels besteht zu 80% aus hydratisiertem extrazellulärem Material und zu 20% aus Knorpelzellen. Die Matrix enthält 80% Wasser und 20% organische Makromoleküle. Diese bestehen zu 60% aus Collagen, 30% aus Proteoglykanen und 10% aus verschiedenen Glykoproteinen.¹³

1.2.2.3 Collagen

Collagen liegt zu 90% als Collagen II vor. Die restlichen 10% des Collagengehalts entfallen auf die Typen IX, X und XI. Im Gelenkknorpel kommt zusätzlich Collagen Typ VI vor. Die Collagene bilden feine Fibrillennetze. In den oberflächlichen Regionen

verlaufen die Fibrillen hauptsächlich parallel zur Oberfläche (Tangentialfasern), während in tieferen Regionen die Fibrillen bevorzugt senkrecht (radiär) bis schräg (arkadenförmig) zur Oberfläche ausgerichtet sind (vgl. Abb. 1). Dieses Verlaufsmuster der Collagenfibrillen ist besonders regelmäßig in Gelenkknorpel, Epiphysenfuge und Knorpel der Atemwege und Rippen ausgeprägt.^{13,85}

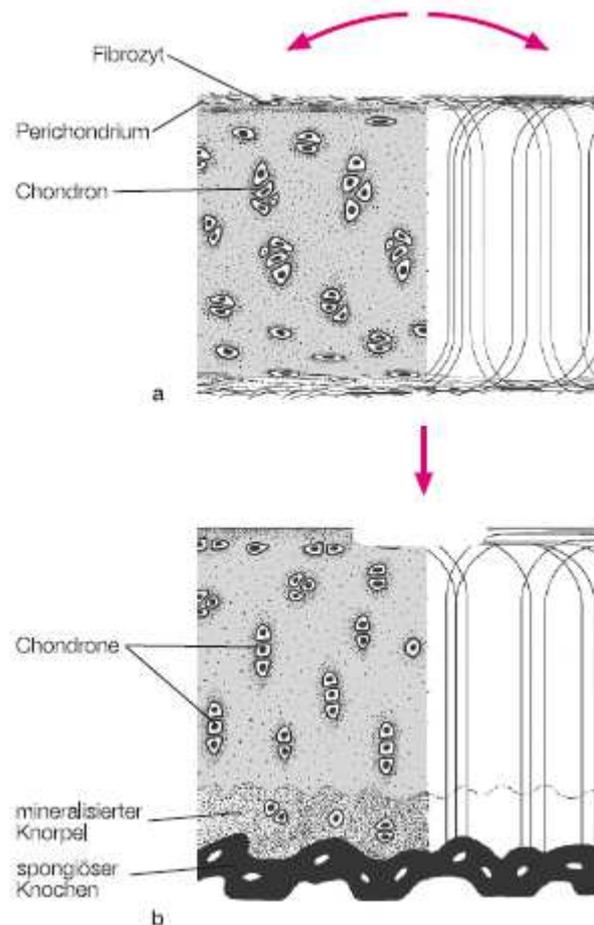


Abbildung 1 Hyaliner Knorpel, Anordnung der Knorpelzellen und Verlauf der Collagenfasern. **a Rippenknorpel:** Die Collagenfasern verlaufen S-förmig. **b Gelenkknorpel:** Die Collagenfasern bilden Arkaden. Die Pfeile geben die Richtungen der möglichen Kräfteinwirkung an. (aus Schiebler, T.H.: Anatomie; Steinkopff, 2007; mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

1.2.2.4 Proteoglykane

Proteoglykane bestehen aus einem gestreckten zentralen Protein (Core-Protein), von dem zahlreiche unverzweigte Glykosaminoglykanketten verschiedener Zusammensetzung ausgehen. Das Core-Protein bindet einerseits an gestreckte Hyaluronsäuremoleküle, andererseits an Collagenfibrillen (vgl. Abb. 2). Das wichtigste

Proteoglykan des Knorpels ist Aggrecan. Ein Aggrecan-Molekül besitzt etwa 100 Glykosaminoseitenketten vom Typ des Chondroitin 4- und 6-Sulfats und 20-80 Seitenketten vom Typ des Keratansulfats. Die Sulfatgruppen bewirken eine starke negative Ladung, die dazu führt, dass die Seitenketten sich gegenseitig abstoßen und steif vom Molekül abstehen. Dadurch werden Oberfläche und Wasserbindungskapazität des Aggrecans enorm gesteigert.

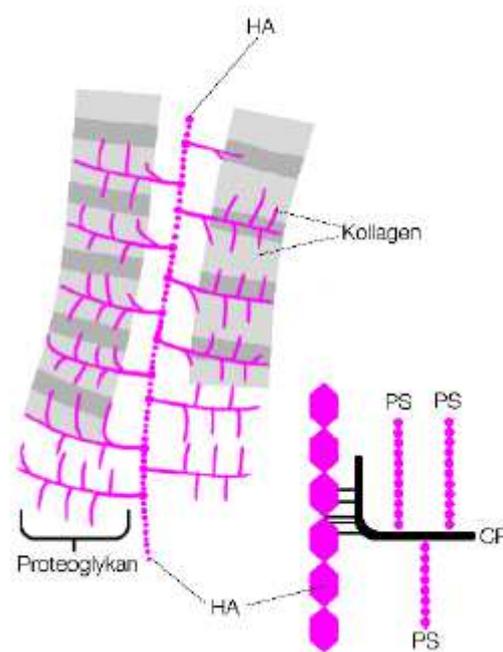


Abbildung 2 Interzellulärsubstanz. Proteoglykane sind durch ihren hohen Proteinanteil (*CP* core protein) einerseits an Hyaluronsäurestränge (*HA*), andererseits an Kollagenfibrillen gebunden. *PS* Polysaccharidketten (Glykosaminoglykane) (aus Schiebeler, T.H.: Anatomie; Steinkopff, 2007; mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

Im Knorpel liegt Aggrecan in einer Konzentration von 0,1 – 0,2 g/ml vor, ist also auf 1/5 – 1/10 seines voll hydratisierten Volumens komprimiert. Der daraus resultierende Quelldruck (200 N/cm^2) wird durch das dichte Kollagenfibrillensystem aufgefangen. Dadurch entsteht eine Matrix von prall elastischer Konsistenz.^{13,85}

1.2.3 Entwicklung und Wachstum

Wie alle Binde- und Stützgewebe ist auch das Knorpelgewebe mesenchymaler Herkunft. Die Knorpelentwicklung erfolgt in Gebieten, in denen große Zug- und Scherkräfte wirken.

Die Knorpelbildung wird ab der 5. Embryonalwoche durch das Zusammenrücken von Mesenchymzellen eingeleitet. Sie werden zu rundlichen, knorpelbildenden Zellen (Chondroblasten), welche alle Komponenten der Knorpelsubstanz synthetisieren. Durch die abgelagerte Matrix werden die Chondroblasten wieder auseinandergedrängt und zu Chondrozyten umgebildet. Durch die Teilung von Chondrozyten entstehen kleine Zellgruppen (Chondrone). Die Chondrone bilden zusammen mit dem sie umgebenden Matrixsaum die Territorien. Zwischen den Territorien gelegene Matrixareale bilden das Interterritorium. Das Knorpelwachstum durch Zellteilung und Matrixsynthese nennt man interstitielles Wachstum. Später wächst der Knorpel appositionell, d.h. von der Knorpeloberfläche aus.^{10,13,85}

1.2.4 Knorpelarten

1.2.4.1 Hyaliner Knorpel

Hyaliner Knorpel ist die häufigste Knorpelart. Makroskopisch erscheint er milchglasartig-bläulich. Typisch sind Collagenfasern vom Typ II. Histologisch gliedert sich hyaliner Knorpel in mehr oder weniger weit voneinander entfernte Chondrone und in lichtmikroskopisch homogene Matrix (vgl. Abb. 3). Die collagenen Fasern liegen in Form von Fibrillen vor und sind durch einen Proteoglykan-Mantel maskiert. Die Collagenfibrillen haben einen jeweils charakteristischen, trajektoriellen Verlauf, der von der funktionellen Beanspruchung bestimmt wird. Im Gelenkknorpel, der vor allem Druck ausgesetzt ist, verlaufen sie arkadenförmig zur freien Oberfläche hin. In allen Fällen umgreifen die Collagenfibrillen die Chondrone und bilden unter der Knorpeloberfläche eine Tangentialfaserschicht, die eigentliche Druckschicht des Knorpels. Hyaliner Knorpel tritt u.a. als Gelenkknorpel, Rippenknorpel oder in den Symphysenfugen auf.^{10,85}

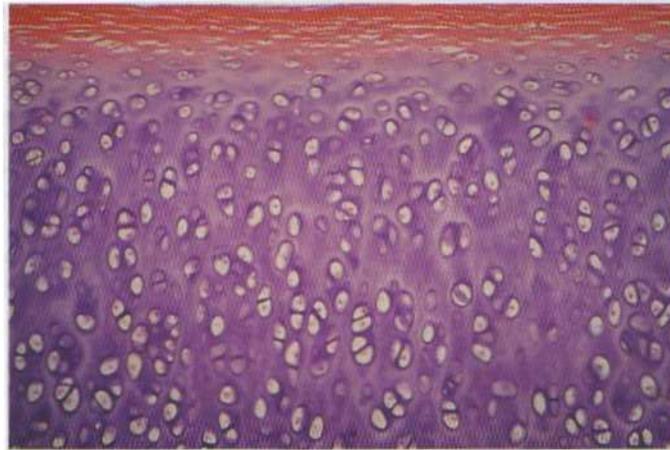


Abbildung 3 Hyaliner Knorpel – Rippenknorpel, Färbung: Hämatoxylin, Vergr. 100fach (aus Kühnel: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie; Thieme, 2002; mit freundlicher Genehmigung des Verlags): Hyaliner Knorpel kommt v.a. in Gelenkknorpel vor und erscheint makroskopisch bläulich. Die Chondrone sind eher größer.

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel, der sich in 4 Zonen aufteilt (vgl. Abb. 4):

1. Mineralisierungszone (Zone IV): Diese Schicht ist sehr dünn (1/10mm) und ist mit der darunter liegenden Knorpeloberfläche fest verbunden. In dieser Zone finden sich relativ wenig Chondrozyten. Die Zone IV behält nach dem Wachstum eine eingeschränkte Fähigkeit zum Ersatz durch Lamellenknochen. Dadurch wird der Gelenkknorpel schmaler.

2. Radiärfaserzone (Zone III): Diese Schicht grenzt sich von Zone IV durch eine stark anfärbare, nur wenige μm dünne Trennlinie ab (tide mark). In dieser Zone sind die Chondrone senkrecht zur Gelenkoberfläche ausgerichtet.

3. Übergangszone (Zone II): In dieser Zone überkreuzen sich die Collagenfasern. Die Chondrone sind uneinheitlich ausgerichtet.

4. Tangentialfaserzone (Zone I): In der obersten Schicht sind die Collagenfasern und Chondrone parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichtet. Die Collagenfasern verlaufen trajektoriell.¹⁴

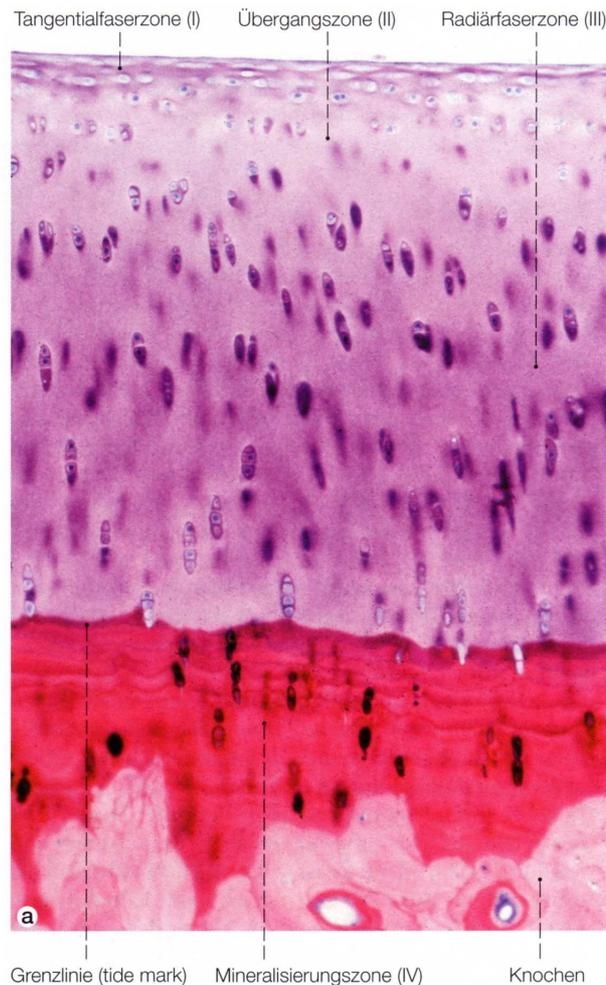


Abbildung 4 Funktioneller Bau und Zonierung des hyalinen Gelenkknorpels. (a) Senkrechter Schnitt durch den Gelenkknorpel des Schienbeinkopfes. Vergr. 120fach. (aus Benninghoff Drenckhahn: Anatomie Band 1; Urban & Fischer, 2003; mit freundlicher Genehmigung des Verlags): Hyaliner Gelenkknorpel besteht aus 4 Zonen, der Tangentialfaserzone (I), der Übergangszone (II), der Radiärfaserzone (III) und der Mineralisierungszone (IV). Die Collagenfasern folgen je nach Zone einem senkrechten (II), einem trajektorialen oder einem parallelen Verlauf (I).

1.2.4.2 Elastischer Knorpel

Elastischer Knorpel ähnelt dem hyalinen Knorpel, die Chondrone sind jedoch kleiner und enthalten nur wenige Zellen, die aber größer sind als beim hyalinen Knorpel (vgl. Abb. 5). Durch das zusätzliche Vorkommen nicht-maskierter elastischer Fasern erscheint er makroskopisch gelblich. Elastischer Knorpel tritt nur an wenigen Stellen auf, z.B. in der Ohrmuschel und im äußeren Gehörgang.^{10,13,85}

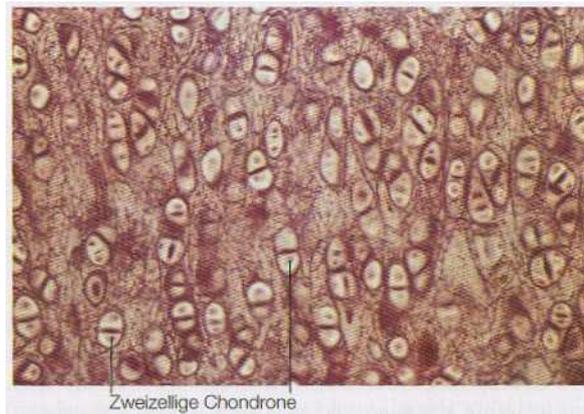


Abbildung 5 Elastischer Knorpel, Ohr, Resorcin-Fuchsin-Färbung, Vergr. 150fach (aus Benninghoff Drenckhahn: Anatomie Band 1; Urban & Fischer, 2003; mit freundlicher Genehmigung des Verlags): Elastischer Knorpel erscheint makroskopisch gelblich, die Chondrone sind eher kleiner.

1.2.4.3 Faserknorpel

Faserknorpel unterscheidet sich von den anderen Knorpelarten dadurch, dass in den Interterritorien Collagenfasern vom Typ I vorkommen. Der Faserknorpel besitzt deshalb eine weiße Farbe und ist nicht transparent. Die Grundsubstanz ist reduziert und die Chondrone sind in der Regel klein, spärlich und enthalten nur einen oder wenige Chondrozyten (vgl. Abb. 6). Faserknorpel tritt u.a. in der Symphysis pubica und dem Anulus fibrosus der Bandscheibe auf.^{10,13,85}

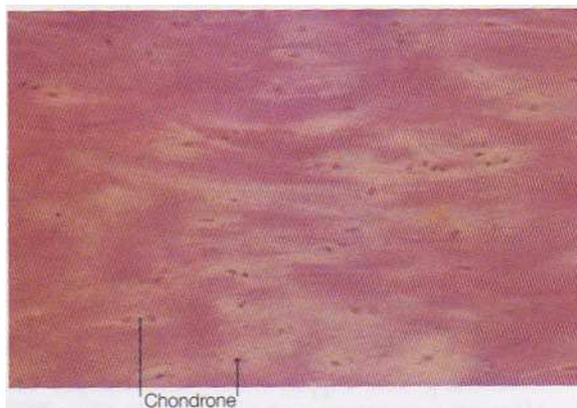


Abbildung 6 Faserknorpel, Discus intervertebralis, HE, Vergr. 150fach (aus Benninghoff Drenckhahn: Anatomie Band 1; Urban & Fischer, 2003; mit freundlicher Genehmigung des Verlags): Faserknorpel enthält nur kleine, spärliche Chondrone. Im Gegensatz zu den anderen Knorpelarten enthält er Collagen Typ I.

1.2.5 Arthrotische Degeneration

Gelenkknorpel hat keine bzw. nur sehr eingeschränkte Fähigkeit zur Regeneration.^{67,94} Er enthält einige Chondroblasten, die zeitlebens teilungsfähig sind. Diese sind in der Lage, durch Proliferation und Produktion von Interzellulärsubstanzen kleine Gewebedefekte zu heilen. Allerdings ist die Regenerationsfähigkeit begrenzt.¹⁴ Unbehandelte Läsionen können zur Entwicklung von Arthrose führen.⁹⁴ Fehlende oder zu hohe Druckbeanspruchung des Knorpels führen zum Untergang des Knorpelgewebes. Diese degenerativen Veränderungen (Arthrosen) sind meist mit einer reaktiven Vermehrung und Mineralisierung des subchondralen Knochens vergesellschaftet. Wenn die subchondrale Knochenschicht freigelegt ist, kommt es zu Knochenabrieb und entzündlichen Veränderungen, die sehr schmerzhaft sein können.¹⁴ Die Veränderungen in arthrotischem Knorpel sind zahlreich und umfassen morphologische und metabolische Veränderungen der Chondrozyten genauso wie biochemische und strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrixmoleküle.⁶⁹ Diese Veränderungen werden von Zytokinkaskaden und von der Produktion von inflammatorischen Mediatoren angetrieben. Die Chondrozyten von Arthrose-Patienten produzieren einen erhöhten Spiegel an inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α , welche im Gegenzug die Collagensynthese vermindern und die Zahl an abbauenden Proteasen (wie z.B. der Matrixmetalloproteasen) und anderer inflammatorischer Mediatoren, wie z.B. IL-8, IL-6, Prostaglandin E2 und Stickoxid (NO), erhöhen. NO hat vielfältige Effekte auf Chondrozyten. Es führt zur Hemmung der Collagen- und Proteoglykansynthese, zur Aktivierung der Matrixmetalloproteasen und zu einer erhöhten Empfindlichkeit für andere oxidative Schäden. Weitere Effekte von NO und anderen oxidativen Schäden sind vorzeitige Alterung und Apoptose. Dies passt auch zu der Annahme, dass die Arthrose eine Erkrankung des vorzeitig gealterten Gelenks ist. In Chondrozyten-Histologien von an Arthrose erkrankten Patienten ließ sich die Alterung anhand von verkürzten Telomeren, erhöhten B-Galactosidase-Spiegeln und verminderter ATP-Produktion auf Grund von mitochondrialer Dysfunktion nachweisen. Diese Funde untermauern die Annahme, dass die Arthrose altersabhängig, mechanisch und chemisch bedingt ist.⁵⁶

1.3 Progressive pseudorheumatoide Dysplasie (PPD)

1.3.1 Klinik und Pathogenese

Die PPD ist auch unter den Bezeichnungen progressive pseudorheumatoide Chondrodysplasie⁹¹, PPAC (progressive pseudorheumatoid arthritis of childhood)⁶⁴ und SEDT-PA (spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy)¹⁰⁹ bekannt. Ihre Inzidenz liegt bei 1:1000000 in UK; in den Ländern des Mittelmeerraums, des Mittleren Ostens und in den Golfstaaten ist sie wahrscheinlich höher^{47,57}.

Die Symptome der PPD entwickeln sich im Alter zwischen 3 und 8 Jahren^{47,57,60,73,24}.

Die PPD ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung^{91,36,73,47,57,60} des Skelettsystems^{73,47,57,60}. Die Ursache liegt in einer loss of function-Mutation des Gens WISP-3⁶⁰. WISP-3 wird dem 3-cM-Intervall auf dem Genlocus 6q22 zugeordnet^{47,36}.

Klinisch ähnelt sie der juvenilen idiopathischen Arthritis oder der rheumatoiden Arthritis^{34,12,24}. Sie äußert sich in Symptomen wie eingeschränkter Gelenkmobilität^{92,64,68,12,33,91}, ossärer Schwellung v.a. der Interphalangealgelenke und anderer Gelenke^{92,68,24,47,91}, inflammatorischer Gelenkschmerzen^{12,24,33} sowie mit Gelenkkontrakturen^{47,24,12}. Die Symptome der PPD treten im Alter zwischen 3 und 8 Jahren zum ersten Mal auf. Die Fingergelenke sind mit symmetrischer Steifheit und Schmerz zuerst betroffen. Später sind dann auch die Knie und die Hüfte beteiligt⁵⁷.

Es kommt zu Knorpelverlust und destruktiven Knochenveränderungen⁴⁷, die sich dann in eingeschränkter Beweglichkeit, Kontrakturen und Wachstumsretardierung äußern⁵⁷.

In der dritten Lebensdekade wird dann oft eine chirurgische Gelenkersatztherapie nötig⁴⁷.

Die radiologischen Zeichen ähneln denen der spondyloepiphysären Dysplasie tarda³⁴ (vgl. Abb. 7) und äußern sich in Platyspondylie, Epiphysenerweiterung, Hüftdysplasie, Osteoarthrose mit ausgedehnter synovialer Osteochondromatose, vertebraler Abflachung, intravertebralen Herniationen, Mega Os trigonum, dysplastischen Knochenveränderungen, Gelenkspaltverschmälerung und Osteophyten

^{91,92,64,52,68,24,33,60,57,12,47}.

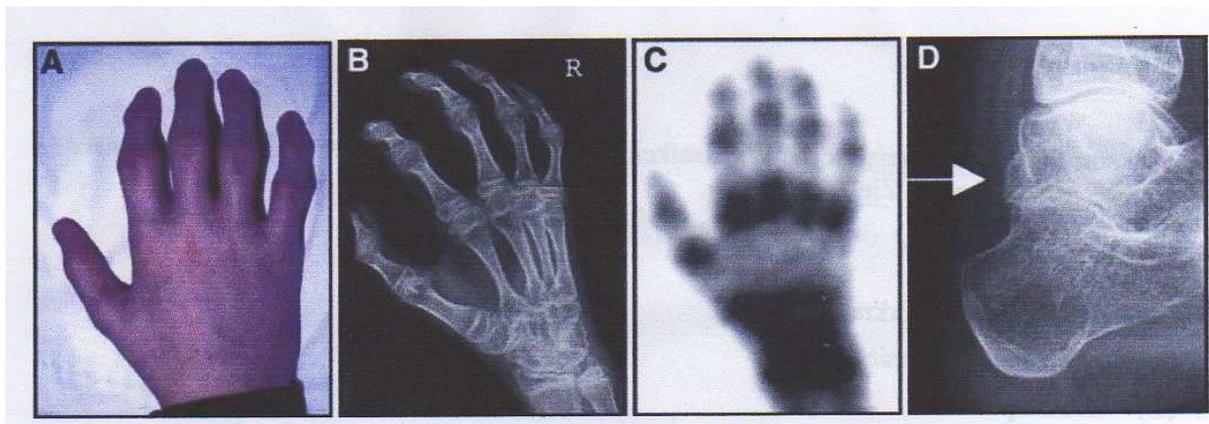


Abbildung 7 A-D Klinische, radiografische und szintigrafische Bilder der rechten Hand. **A** Schwellung der interphalangealen Gelenke, **B** korrespondierend mit den epiphysären Erweiterungen der Röhrenknochen, **C** und der erhöhten metabolischen Aktivität (Tracer-Uptake nach 2 Stunden). **D** Der Pfeil verweist auf ein Mega Os trigonum des linken Fußes (aus: Ehl S., Uhl M., Berner R., Bonafé L., Superti-Furga A., Kirchoff A.: Clinical, radiographic, and genetic diagnosis of progressive pseudorheumatoid dysplasia in a patient with severe polyarthropathy; *Rheumatology International*, 2003, published online; mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

1.3.2 Histologie und Labor

Nach Gelenkersatzoperationen wurde der Knorpel am entfernten Gelenk untersucht und dabei wurde festgestellt, dass sich das Knorpelgewebe histologisch nicht von Knorpel im Endstadium der Arthrose unterscheidet⁶⁰. Bei Beckenkammpunktionen wurden Chondrozytenester^{92,47,91} mit pyknotischen Nuclei, unregelmäßiger Grundsubstanz und spiraligen Fibrillenbündeln⁹¹ gefunden. Die normale Säulenbildung in Wachstumszonen war nicht vorhanden⁴⁷. Entzündungsparameter wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit und das C-reaktive Protein sind normal^{24,12,57,68,91,33}. Auch die Titer für die antinukleären Antikörper^{57,91} und den Rheumafaktor⁵⁷ sind negativ.

1.3.3 Differentialdiagnosen, Therapie und Prognose

Die PPD könnte durchaus auch mit anderen Erkrankungen aus dem orthopädischen Formenkreis verwechselt werden wie z.B. mit der juvenilen idiopathischen Arthritis (juvenile rheumatoide Arthritis), die sich von der PPD allerdings u.a. durch die positiven Entzündungsparameter unterscheidet^{47,52,24,68,12,57,91}. Das Stickler-Syndrom unterscheidet sich von der PPD v.a. durch die ophthalmologischen Besonderheiten

(z.B. progressive Myopie)^{33,91}. Auch das Kniest-Syndrom unterscheidet sich von der PPD z.B. durch die Myopie und die Schwerhörigkeit³³, ebenso wie die Spondyloepiphysäre Dysplasie tarda, die sich durch die Myopie und eine mögliche Ablatio retinae von der PPD unterscheidet³³. Der M. Scheuermann wiederum unterscheidet sich von der PPD u.a. durch das spätere Erkrankungsalter (Pubertät)^{68,92}. Eine kausale Therapie ist zurzeit nicht verfügbar. Der Schmerz und die Bewegungseinschränkung werden mit NSAR und Physiotherapie behandelt. Die Lebenserwartung ist nicht vermindert, aber die Prognose für die Gelenke ist schlecht. Es kommt zu progressiver Gelenkdegeneration und Ankylose. Ein Gelenkersatz in der dritten Lebensdekade wird häufig erforderlich. Eine begleitende intensive psychologische und physiotherapeutische Betreuung ist sinnvoll^{57,60}.

1.4 Die CCN-Familie

Die CCN-Familie besteht aus sechs Proteinen. Sie beinhaltet CYR61/CCN1 (cysteine-rich 61), CTGF/CCN2 (connective tissue growth factor), NOV/CCN3 (nephroblastoma overexpressed) und die WISP-Proteine WISP-1/CCN4, WISP-2/CCN5 und WISP-3/CCN6 (Wnt-induced secreted proteins). Diese Proteine weisen eine ähnliche Grundstruktur auf. Sie sind zwischen 30 und 40 kDa schwer und sind extrem cysteinreich (10% der Masse). CCN-Proteine sind aus vier Modulen zusammengesetzt (vgl. Abb. 8). Modul 1 ist eine IGFBP-Domäne (insulin-like growth factor binding protein), Modul 2 ist eine von Willebrand Typ C-Domäne, Modul 3 ist eine Thrombospondin 1-Domäne und Modul 4 ist eine C-terminale Domäne, die einen Cystein-Knoten enthält.

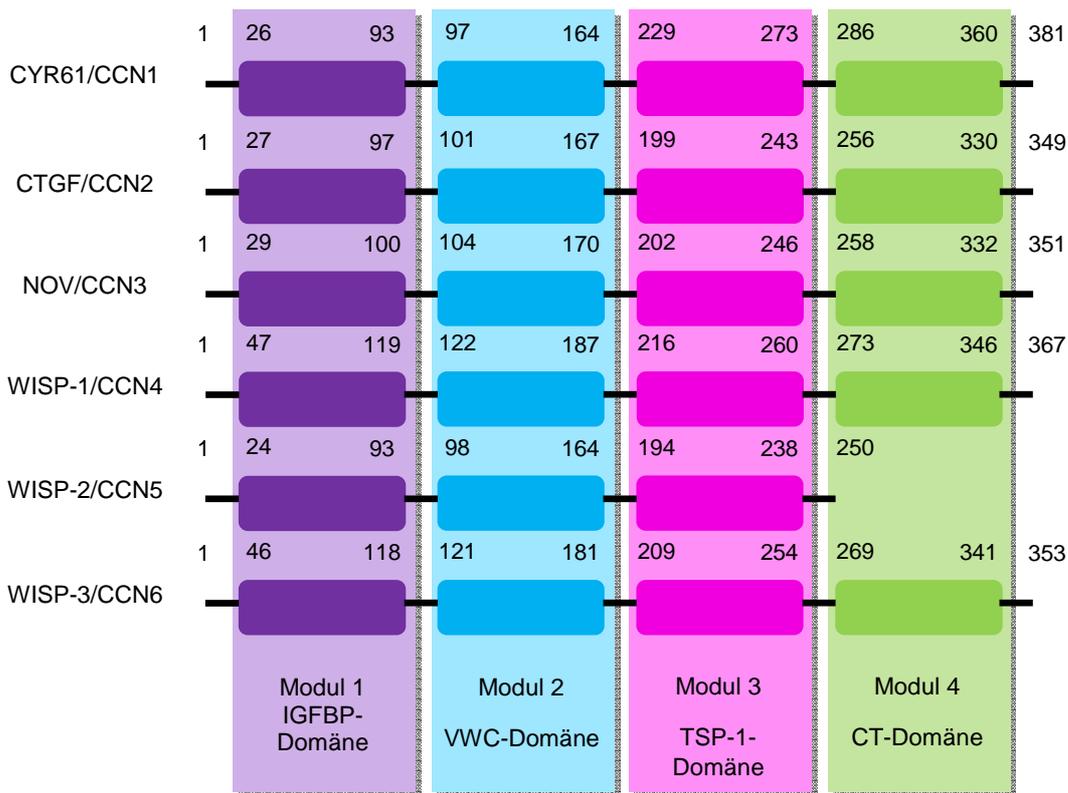


Abbildung 8 Die modulare Struktur der CCN-Familie: Die CCN-Proteine bestehen aus je 4 Modulen, Modul 1 ist eine IGFBP-Domäne (insulin-like growth factor binding protein), Modul 2 ist eine von Willebrand Typ C-Domäne, Modul 3 ist eine Thrombospondin 1-Domäne und Modul 4 ist eine C-terminale Domäne, die einen Cystein-Knoten enthält.

Eine am N-Terminus lokalisierte Signalsequenz und eine Gelenkregion zwischen Domäne 2 und 3 beeinflussen die Sekretion und die Empfindlichkeit gegenüber einer Spaltung durch Proteinase. Gespaltene Fragmente besitzen möglicherweise ebenfalls biologische Funktionen. CCN-Proteine sind keine Wachstumsfaktoren, sondern modifizieren den Signalweg anderer Moleküle. Sie spielen eine Rolle bei Mitose, Adhäsion, Apoptose, Produktion der extrazellulären Matrix, Wachstumsbeschränkung und Migration unterschiedlicher Zellarten. Außerdem regulieren sie die Angiogenese, das Tumorwachstum, die Plazentation, die Implantation, die Embryogenese und die enchondrale Ossifikation. Die CCN-Proteine haben unterschiedliche Zielzellen, u.a. Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Nervenzellen. Sie ermöglichen die Kommunikation zwischen der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche. Die Domänen 3 und 4 binden an Integrine, Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 und Heparansulfatproteoglykane, um die intrazellulären

Signaltransduktionswege zu aktivieren. Andererseits schwächen die CCN-Proteine Aktivitäten der extrazellulären Matrix und der mit ihr assoziierten Wachstumsfaktoren wie TGF- β , BMP-4, IGF und VEGF ab.

Wie bereits erwähnt, spielen die Mitglieder der CCN-Familie eine wichtige Rolle in der Angiogenese während der normalen Entwicklung von Gewebe und Organen und auch während der Tumorangiogenese. Außerdem wirken sie in der Chondrogenese und der Osteogenese mit. Es hat sich gezeigt, dass die CCN-Proteine wahrscheinlich in ein homöostatisches System eingebunden sind, in dem ein Protein einen Prozess positiv beeinflussen kann, während ein nah verwandtes Protein denselben Prozess verhindert. Durch die Involvierung in ein breites Spektrum biologischer Vorgänge können die CCN-Proteine das letztendliche Verhalten von normalen, erkrankten und kanzerösen Zellen mitbestimmen.^{110,47,21,78,54,73}

1.4.2 Die einzelnen Proteine

1.4.2.1 CYR61/CCN1

CYR61 ist (ebenso wie CTGF) östrogeninduzierbar und überexprimiert in steroidabhängigen Mamma- und Gebärmutterkarzinomen. Das Protein begünstigt die Progression des Mammakarzinoms und wird mit der weiter fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert, möglicherweise durch die Regulierung von Invasion, Metastasierung und Neovaskularisierung. Des Weiteren wurde eine mögliche Involvierung von CYR61 in die Pathogenese des Pankreaskarzinoms und der chronischen Pankreatitis festgestellt.

Außerdem fördert es die Kollagen- und Knorpelproduktion und stimuliert die Chondrogenese, die Mitogenese und die Adhäsion in mesenchymalen Zellen. Die CYR61-Produktion wird dabei von Faktoren, die u.a. für den Knochenmetabolismus wichtig sind, wie z.B. Vitamin D3, TNF α , EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) und IL-1 β (Interleukin 1 β), reguliert. Die Ausschüttung von CYR61 ist auch von mechanischen Stimuli in glatten Muskelzellen abhängig.

Zusätzlich wird CYR61 in Riesentrophoblasten exprimiert und erleichtert die Entwicklung von kapillären Netzwerken, ist also ein angiogener Faktor.

Durch die Expression in Fibroblasten wird die kutane Wundheilung unterstützt. Dabei bindet CYR61 an die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$ auf Endothelzellen und Thrombozyten und an das Integrin $\alpha 6\beta 1$ und an Heparansulfatproteoglykane auf primären Fibroblasten, was zu zytoskelettaler Reorganisation, Zellausbreitung und Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen führt. Unterstützt wird die Wundheilung durch die Bindung von CYR61 an Integrin $\alpha M\beta 2$ auf Monozyten.^{25,21,78,88,44,87,98,102}

1.4.2.2 CTGF/CCN2

CTGF stimuliert die Bindegewebsproliferation, die Synthese der extrazellulären Matrix und die Fibroblastenproliferation. Außerdem ist es in die fetale Entwicklung, in die Angiogenese, in die enchondrale Ossifikation und in entzündliche Prozesse miteingebunden. Es zeigte sich, dass CTGF auch bei der Regulierung der Funktion von Osteoblasten und Chondrozyten mitwirkt, möglicherweise indem es die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix modifiziert.

CTGF ist in die Wundheilung involviert, wobei bis zum 10.Tag die CTGF-Level kontinuierlich steigen, um dann wieder abzufallen. Ebenso wie bei CYR61 wird auch die Bindung von CTGF an Monozyten durch Integrin $\alpha M\beta 2$ vermittelt.

Eine Überexpression von CTGF spielt auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose, bei der Hautfibrose und bei vielen fibrotischen Funktionsstörungen. CTGF ist in die mitogenen und matrigenen Aktivitäten von TGF- β involviert, das in allen fibrotischen Funktionsstörungen überexprimiert wird. Es wird außerdem durch TNF- α über den NF κ B-Signalweg beeinflusst.

CTGF findet sich auch in uterinen Zellen während des Menstruationszyklus und während der ersten Tage der Schwangerschaft. Es ist östrogen-induzierbar und in steroidabhängigen Brust- oder Gebärmuttertumoren überexprimiert. Es wird generell von Östrogen und Progesteron reguliert und scheint für den Erhalt und das Remodeling der stromalen extrazellulären Matrix wichtig zu sein. Desweiteren wird CTGF während der Entwicklung der diabetischen Nephropathie früh hochreguliert.

Alle CTGF-Formen (auch trunkierte Formen) binden an Heparin und können durch Serinproteasen in begrenztem Ausmaß proteolysiert werden.^{105,7,72,78,45,58,87,43,20,21,61,82,77}

1.4.2.3 NOV/CCN3

NOV bindet ebenso wie CYR61 und CTGF an Integrine der Zelloberfläche und induziert somit intrazelluläre Signalkaskaden, die z.B. die Gentranskription beeinflussen, und wirkt in der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung mit. Eine Überexpression kann dabei zu einem dramatischen Anstieg der Zellproliferation und des Zellwachstums führen. Trunkierte NOV-Formen, denen z.B. die IGFBP-Domäne fehlt, zeigen diesen Effekt übrigens nicht. Außerdem hat es, ebenso wie CYR61 und im Gegensatz zu WISP-3, eine angiogene Wirkung. Die Expression von NOV wird mit der Differenzierung der gestreiften Muskulatur und mit der Entwicklung von Wilms-Tumoren und Nierenzellkarzinomen assoziiert. Desweiteren spielt NOV eine Rolle im Calcium-Signalweg und damit im Knochenstoffwechsel und ebenso in der Differenzierung von Chondrozyten.^{21,23,93,27,38,111}

1.4.2.4 WISP-1/CCN4

WISP-1 hat im Gegensatz zu CYR61 eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum. Die Bindung von WISP-1 wird durch Dermatansulfatproteoglykane vermittelt, die mit Decorin und Biglycanen interagieren.^{78,28,31}

1.4.2.5 WISP-2/CCN5

WISP-2 fehlt, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der CCN-Familie die C-terminale Domäne. WISP-2 spielt eine wichtige Rolle in der Funktion von Osteoblasten und von Chondrozyten und in der Adipogenese. Außerdem wird es in Brustkrebszellen durch Östrogen induziert und stimuliert die Aggressivität.^{89,21,28,78}

1.4.2.6 WISP-3/CCN6

WISP-3 ist ein Zellmembran-assoziiertes Protein und bindet an Heparin. Es ist essentiell für normales postnatales Skelettwachstum und unterstützt die Knorpelhomöostase, indem es die Expression von Collagen II und Aggrecan reguliert. Außerdem begünstigt es die Expression und Aktivität der Superoxid-Dismutase in Chondrozyten. Dabei ist WISP-3 eher in die Erhaltung des Knorpels als in die Morphogenese involviert.

WISP-3 enthält eine Mikrosatelliten-Region, die für frameshift-Mutationen empfänglich ist und zu einem trunkierten Protein führt. Mutationen von WISP-3 führen über eine Dysregulation von BMP- und Wnt-Signalkaskaden zur autosomal rezessiven progressiven pseudorheumatoiden Dysplasie und damit zu Knorpelverlust und Gelenkdegeneration. Störungen in der Regulation von BMP- und anderen Signalwegen sind als Risikofaktoren für die gewöhnliche Arthrose bekannt. Generell wird es in an rheumatoider Arthritis erkrankter Synovia und in deren Synoviozyten stärker exprimiert als in normaler Synovia und in an Arthrose erkrankter Synovia.²⁶

Desweiteren kontrolliert WISP-3 als Tumorsuppressor das Tumorwachstum und dessen Invasivität und hat eine anti-angiogene Wirkung. Bei Patientinnen mit inflammatorischem Mammakarzinom wurde eine reduzierte Expression von WISP-3 beobachtet. Eine Mutation von WISP-3 wurde in 31% der kolorektalen Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität festgestellt.^{90,73,47,54,60,21,29,59,26,97}

1.5 Dedifferenzierte Chondrozyten

Die Expansion von Chondrozyten wird typischerweise in Monolayer(2D)-Zellkulturen durchgeführt. Dies führt zur Dedifferenzierung in einen fibroblastischen Phänotypen, erlaubt aber die Produktion größerer Zellzahlen. Dabei sinkt jedoch mit steigender Passagezahl die Expression von Collagen II. Es kommt zu einer erhöhten Stress-Antwort und Inflammation. Die Herunterregulierung von Genen des anabolen Metabolismus und die Hochregulierung von Protease-Genen führen zu einem Schwund von extrazellulärer Matrix. Dabei führen die verminderte Produktion von Wachstumsfaktoren und die erhöhte Apoptose-Rate zu einer verminderten Zellproliferation.

Die Zellkultur von Chondrozyten in Zellträgern, sogenannten Scaffolds (3D), unterstützt die Erhaltung des chondrozytären Phänotyps und induziert die Redifferenzierung, reduziert aber das Ausmaß der Proliferation, führt also zu niedrigeren Zellzahlen. Für eine komplette Redifferenzierung werden außerdem externe Stimuli wie z.B. Collagen II, TGF-beta oder IGF-I benötigt. Als externer Stimulus hat sich nun auch Insulin als potentes Mittel in Kulturmedien eingebracht, dass die Redifferenzierung und den Reifungsprozess unterstützt. Auch dynamische Kompression kann die dedifferenzierten Chondrozyten reaktivieren.

Das beste Ergebnis wurde bei der Aussaat von Chondrozyten in Scaffolds nach vorheriger Vermehrung in Monolayer-Zellkulturen erreicht. Es zeigte sich, dass die Erhöhung der Zelldichte in der Aussaat von artikulären Chondrozyten in Scaffolds die Chondrogenese signifikant verbesserte, auch wenn die ausgesäten Zellen in der Monolayer-Zellkultur umfangreicher vermehrt und dedifferenziert werden mussten.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Monolayer-Kultivierung von Chondrozyten ist die Aussaat auf Hydrogeloberflächen. Im Gegensatz zum üblichen zweidimensionalen Polystyren-Substrat führt die Aussaat auf neutralen Hydrogelen mit niedriger Ladungsdichte zu einer spontanen Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten.

Desweiteren wurde festgestellt, dass auch die Ko-Kultivierung von humanen mit bovinen dedifferenzierten Chondrozyten einen positiven Effekt aufweist. Es zeigte sich eine vermehrte Produktion von Collagen II und Proteoglykanen und eine stabile Redifferenzierung, wobei die Kultivierung nicht in direktem Kontakt angelegt wurde, sondern in derselben Vertiefung einer Multi-Well-Platte. Dies weist darauf hin, dass ein löslicher Faktor für die Redifferenzierung der Chondrozyten verantwortlich ist, der nicht speziesspezifisch ist.^{37,3,48,108,2,5,95,106,86,96,50,62,39,32,112,63}

1.6 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Mesenchymale Stammzellen aus humanem Knochenmark sind nicht-hämatopoetische Zellen mit pluripotenten Eigenschaften, d.h. sie können sich zu verschiedenen mesenchymalen und nicht-mesenchymalen Zelllinien differenzieren. Unter anderem ist ihre Möglichkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Gewebe unter geeigneten in vitro- und vivo-Bedingungen bekannt, wie z.B. zur adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung. Diese Eigenschaft macht sie zu potentiellen Kandidaten für Knorpelgewebezüchtung. In letzter Zeit zeigte sich auch ihr Potential in der myogenen, v.a. in der kardiomyogenen Differenzierung. Auch die Bildung von neuronalen Zellen wurde schon erprobt. Um das chondrogene Potential von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, wurden in verschiedenen Studien sowohl Stammzellen aus Knochenmark als auch Stammzellen aus fetalem Lungengewebe und aus Plazentaanteilen verglichen. Es zeigte sich, dass Stammzellen aus Knochenmark bessere chondrogene Fähigkeiten besitzen. Mesenchymale

Stammzellen haben die Fähigkeit, Kolonien auf glatten Plastikflächen zu bilden und dort schnell und stabil zu adhären. Morphologisch sind sie an ihrem fibroblastoiden Phänotyp zu erkennen. Um das optimale Kulturmedium zu finden, wurden fötales Rinderserum (FBS), autologes Serum (AS) und allogenes humanes Serum (alloHS) verglichen. Die Wahl des Kulturmediums beeinflusst das Wachstum der mesenchymalen Stammzellen auf verschiedenen Ebenen. AlloHS führte bei den Stammzellen zum Wachstumsstopp und zum Tod. Die Stammzellen proliferierten in AS schneller als in FBS, jedoch führte die Kultur in FBS zu einer schnelleren Differenzierung zu mesenchymalen Zelllinien als die Kultur in AS. Die Gen-Expression ist zu späten Passagezeitpunkten in AS stabiler als in FBS. Mesenchymale Stammzellen können in AS also schnell und mit stabiler Gen-Expression vermehrt werden, während FBS eine differenziertere, aber weniger stabile Kultivierung gewährleistet. Auf Grund ihrer Pluripotenz sind mesenchymale Stammzellen eine attraktive Quelle für Zellen in den vielversprechenden Bereichen der Zelltherapie, der regenerativen Medizin, der Immunmodulation und des Tissue Engineering.^{30,15,49,53,99,1,101,76,18,84}

1.7 Ziel der Arbeit

WISP-3 ist ein Signalprotein, welches der Familie der CCN-Proteine angehört. Die CCN-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion, Proliferation und Differenzierung.

Es ist bekannt, dass eine Funktionsverlust-Mutation von WISP-3 zu der autosomal-rezessiven Knorpel- und Knochenerkrankung Progressive Pseudorheumatoide Dysplasie (PPD) führt. Der Funktionsverlust von WISP-3 verursacht Knorpelverlust und Gelenkdegeneration. Daraus lässt sich schließen, dass WISP-3 für die normale Knorpelhomöostase und das postnatale Skelettwachstum von Bedeutung ist.

Andere Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis wie z.B. die Arthrose beruhen ebenso wie die PPD auf Knorpeldegeneration. Wenn WISP-3 tatsächlich pharmakologisch eingesetzt werden könnte, um das Knorpelwachstum zu fördern, wäre das ein neuer Schritt in der Behandlung der Arthrose, die bisher rein symptomatisch behandelt wird.

Aufgabe in dieser Arbeit war es nun, die Wirkung von WISP-3 auf dedifferenzierte Chondrozyten und auf mesenchymale Stammzellen in der Pellet-Kultur zu beobachten. Es wurden mesenchymale Stammzellen und dedifferenzierte Chondrozyten in Monolayer-Zellkulturen vermehrt und im Anschluss in Pellet-Kulturen unter Zusatz von WISP-3 und Wachstumsfaktoren ihre Größenzunahme evaluiert. Das Ausmaß der chondrogenen Differenzierung wurde mittels histologischer Färbungen wie H&E und Alcian-Blau, Immunhistochemie (Collagen Typ II-Antikörper-Färbung) sowie mittels der Polymerase-Kettenreaktion bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Zellen

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen (MSC 302, MSC 317, MSC 322) und dedifferenzierten Chondrozyten (KN 350, Ch. Pat.1, Ch. Pat.2) zu dieser Arbeit stammen aus Gewebe, das bei der operativen Versorgung von Patienten in der Universitätsklinik Würzburg anfiel. Die Patienten hatten zuvor ihr Einverständnis erteilt. Bei den Patienten handelte es sich um Männer und Frauen im Alter zwischen 34 und 87 J., das Durchschnittsalter lag bei 60,3 Jahren.

Die Verwendung des biologischen Materials wurde zuvor von der Ethikkommission der Universität Würzburg geprüft und es wurden keine Einwände erhoben (Studien-Nr. 84/01).

Chargennummer	Material	Alter
MSC 302	Hüftkopf + Spongiosa	34 J.
MSC 317	Spongiosa	50 J.
MSC 322	Hüftkopf + Spongiosa	59 J.
KN 350	Vorderes Kreuzband + Knorpel	50 J.
Ch. Pat. 1	Hüftkopf	87 J.
Ch. Pat. 2	Hüftkopf	82 J.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Monolayer-Zellkultur

Die Chondrozyten bzw. MSC wurden in sterilem DMEM-Ham's F12-Medium unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubationsschrank kultiviert. Um Bakterien- und Pilzwachstum zu verhindern, wurden außerdem 100 Einheiten Penicillin sowie 0,1mg Streptomycin und 0,25g Amphotericin B pro ml Medium hinzugefügt. Es wurden ausschließlich 75 und 150 cm²-Zellkulturflaschen verwendet. Das Medium wurde alle 48-72h 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, bei dem 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 5ml (75cm²-Flasche) bzw. 7ml (150cm²) 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflaschen pipettiert. Die Kulturflaschen wurden für 2min im Brutschrank inkubiert. Der Ablösevorgang der Zellen wurde unter dem Durchlichtmikroskop beobachtet. Die Zellen rundeten sich ab und lösten sich vom Boden. Die Trypsinierung wurde mit FCS-haltigem Zellkulturmedium abgestoppt. Es wurde mindestens das gleiche Volumen an Medium bezogen auf die Trypsin-Lösung zur Zellsuspension pipettiert.

Die Zellsuspension wurde in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dann für 5min bei 1200U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet am Boden des Röhrchens wurde in einer definierten Menge frischen Nährmediums aufgenommen. Anschließend erfolgten Zellzählung sowie „dye-exclusion-test“.

2.2.2 Zellzählung – „dye-exclusion-test“

Zur Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen kamen eine Neubauer-Zählkammer und der Trypan-Blau-Exklusionstest („dye-exclusion-test“) zur Anwendung. 100µl Zellsuspension wurden hierzu mit der gleichen Menge Trypan-Blau vermischt, anschließend wurden jeweils 10µl dieses Gemischs 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 bzw. MSC mit dem sog. „dye-exclusion-test“ überprüft. Dieser Test beruht auf der Tatsache, dass intakte und somit teilungsfähige Zellen Farbstoffe wie Trypan-Blau 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:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Summe der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten großen Quadrate}} \cdot 10^4 \cdot 2$$

Der Faktor 10^4 berücksichtigt das Volumen der Neubauer-Zählkammer. Der Faktor 2 bezieht sich auf die Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung.

2.2.3 Pellet-Kultur

In der Literatur werden verschiedene Zellkultursysteme diskutiert, die eine Redifferenzierung expandierter Chondrozyten in funktionelle Knorpelzellen ermöglichen. 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.

Eine der einfachsten Methoden, die diesen Anforderungen gerecht wird, stellt die sog. Pellet-Kultur dar. Dabei werden 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 bzw. MSC das entsprechende Volumen in ein 15ml-Zentrifugations-Röhrchen pipettiert und dies anschließend für 5 min bei $1200 \times g$ 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 zugesetzt. Das Differenzierungsmedium setzte sich zusammen aus DMEM High Glucose, Glutamin, Penicillin und Streptomycin zu Verhinderung von Pilz- und Bakterienwachstum, Ascorbinsäure, Dexamethason, Pyruvat, L-Prolin und ITS⁺1. Je nach Ansatz wurde entweder TGF- β ($1\mu\text{l}$ pro ml) oder TGF- β und WISP3 oder nur WISP3 (500 ng/ml) hinzu gegeben. Pro Zellpellet genügte 1ml Differenzierungsmedium. Die Zellpellets wurden in den Zentrifugationsröhrchen bei 37°C , 5% CO_2 -Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach 72h wurden die Pellets in 48-Well-Platten überführt. Der Wechsel des Differenzierungsmediums fand zweimal wöchentlich statt.

2.3 Histologie

2.3.1 Paraffineinbettung von Zellpellets

2.3.1.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (4% in PBS⁻)

Um 4% Paraformaldehyd herzustellen wurden 4g Paraformaldehyd in ca. 75ml PBS⁻ (PBS-Puffer ohne zweiwertige Ionen) eingewogen. Die Mischung wurde unter Rühren auf einer Heizplatte auf ca. 60°C erhitzt. Nun wurde solange 1 N NaOH zugegeben, bis die Lösung klar war (ca. 100-150µl). Die Lösung kühlte auf Raumtemperatur ab. Der pH wurde mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt. Dann wurde die Lösung mit PBS⁻ auf 100ml aufgefüllt.

Die Zellpellets wurden in je 1 Eppendorf-Cap (1,5ml) überführt. Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt. Dann wurden die Pellets je zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Nun wurden die Pellets in je 1ml 4% Paraformaldehyd 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Fixierlösung für 2 Stunden in Leitungswasser ausgewaschen. Die Pellets wurden dann über Nacht (mindestens 1 Stunde) in 50% EtOH entwässert.

2.3.1.2 Paraffinieren

Die Pellets wurden für je 1 Stunde erst in 70% EtOH, dann in 95% EtOH und dann in 100% EtOH dehydriert. Nun wurden die Pellets 30 Minuten mit EtOH/Amylacetat (1:1) bei Raumtemperatur gewaschen. Dann wurden sie für 30 Minuten mit EtOH/Amylacetat (1:1) bei 56-60°C im Wärmeschrank gewaschen. Daraufhin wurden die Pellets zweimal je 30 Minuten mit Amylacetat bei ca. 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Pellets wurden dann über Nacht in Paraffin I in den Wärmeschrank gestellt. Am folgenden Tag wurden sie in Paraffin II wieder über Nacht in den Wärmeschrank gestellt.

2.3.1.3 Einbettung

Die Edelstahlgießform und die Pinzette wurden im Wärmeschrank vorgewärmt. Die Wärmeplatte wurde auf 70°C vorgewärmt. Die Pellets wurden aus den Eppendorf-Caps entnommen. Die Deckel der Einbettkassetten wurden entfernt. Es wurde etwas Paraffin

in die Edeltstahlgießformen gegeben und je ein Pellet eingebracht. Dann wurde je eine Einbettkassette aufgelegt. Es wurde Paraffin zugegeben, bis die Edeltstahlgießformen vollständig gefüllt waren. Das Paraffin härtete erst bei Raumtemperatur, dann im Kühlschrank aus. Die Edeltstahlgießformen wurden entfernt und die Paraffinblöcke dann bei -20°C gelagert.

2.3.2 Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

2.3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden immer eiskalt geschnitten.

Das Wasserbad wurde auf Stufe 4-5 gestellt. Der Paraffinblock wurde in die Schneidemaschine eingespannt und der Block dicht unter das Messer gebracht. Der Block wurde mit einer Schnittdicke von 40µm angeschnitten. Wenn das Pellet erreicht wurde, wurde die Schnittdicke auf 4µm eingestellt. Die Schnitte wurden zum Strecken in das Wasserbad überführt. Von dort wurden sie auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger mit den Paraffinschnitten trockneten über Nacht.

2.3.2.2 Entparaffinieren von Paraffinschnitten

Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden für 60 Minuten bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Paraffin zu schmelzen. Dann wurden sie zum Entparaffinieren für je 8 Minuten erst in Xylol I, dann in Xylol II gestellt. Es wurde dann eine Rückführung in destilliertes Wasser in einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger zweimal für je 2 Minuten in 95% Ethanol, dann für je 5 Minuten in 70% Ethanol und 50% Ethanol gestellt, um zum Schluss in destilliertes H₂O überführt zu werden.

2.3.3 H&E-Färbung

Die H&E-Färbung ist eine allgemeine Färbung, um Gewebestrukturen und die darin enthaltenen Zellen darzustellen. Hämatoxylin färbt alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen blau, während Eosin alle acidophilen Bestandteile rot färbt.

Die Paraffinschnitte wurden 9 Minuten in Hämatoxylinlösung gefärbt. Dann wurden sie in destilliertem H₂O gespült, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Nun wurden

sie für 3 Sekunden in 0,25% HCl/50% Ethanol differenziert und dann wieder mit destilliertem H₂O gespült. Die Schnitte wurden daraufhin für 10 Minuten in Leitungswasser gebläut und dann für 1-2 Minuten in 1%iger Eosinlösung gefärbt. Die Schnitte wurden in destilliertem H₂O ausgewaschen. Dann wurden sie für 3 Sekunden in 70%igem Ethanol differenziert und dann für 3 Sekunden in 95% Ethanol entwässert. Nun wurden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten in 100% Isopropanol überführt. Dann wurde das Isopropanol entfernt und zweimal für je 5 Minuten Xylol dazugegeben. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit Entellane (organisches Lösungsmittel) und einem Deckglas eingedeckt.

2.3.4 Alcian-Blau-Färbung

Mit der Alcian-Blau-Färbung werden negativ geladene sulfatierte Proteoglykane (z.B. Aggrecan) nachgewiesen. Zellkerne färben sich rosarot, Zytoplasma blassrot und stark saure sulfatierte Bestandteile blau.

Die Paraffinschnitte wurden für 3 Minuten in 3%ige Essigsäure überführt. Dann wurden sie 30 Minuten in 1% Alcianblau 8GX (pH 1,0) gefärbt. Sie wurden mit destilliertem H₂O gespült. Anschließend wurden sie für 2 Minuten mit Kernechtrot gegengefärbt und dann wieder mit destilliertem H₂O gespült. Die Schnitte wurden zuerst für 3 Sekunden in 70%igem Ethanol differenziert und dann für 3 Sekunden in 95%igem Ethanol entwässert. Anschließend wurden sie zweimal für je 5 Minuten in 100% Isopropanol überführt. Das Isopropanol wurde entfernt und daraufhin zweimal für je 5 Minuten Xylol zu den Schnitten zugegeben. Sie wurden dann mit Entellane und Deckgläsern eingedeckt.

2.3.5 Immunhistochemie – Collagen Typ II-Antikörper-Färbung

Die Collagen Typ II-Antikörper-Färbung wird zum Nachweis von Collagen Typ II im Knorpel und in chondrogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen verwendet.

Spezifität: $\alpha 1(\text{II})$ - und $\alpha 3(\text{XI})$ -Ketten mit identischer Primärstruktur

Human, Maus, Huhn, Salamander

Klon: 6B3

Isotyp: Maus IgG₁, monoklonal

Einsatzkonzentration: 714ng/ml

2.3.5.1 Detektion der Bindung des primären Antikörpers (Immunzytochemische Färbung)

Benötigte Materialien:

Waschpuffer:

Für die Herstellung des Waschpuffers (0,05 M TBS pH 7,6) wurden 60,6g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan und 87,66g NaCl in 800ml destilliertem H₂O gelöst. Der pH wurde durch Zugabe von 37%igem HCl auf 7,6 eingestellt. Dann wurde die Lösung mit destilliertem H₂O auf eine Menge von 1000ml aufgefüllt. Um 0,05 M TBS zu erhalten, wurden 100ml des bisher 0,5 M TBS mit 900ml destilliertem H₂O aufgefüllt.

Blockierungslösung:

Für die Herstellung der Blockierungslösung (2% BSA 5% normal horse serum in TBS) wurden 2g BSA in 95ml TBS gelöst und 5ml horse serum dazugegeben.

Detektionssystem: BioGenex Super Sensitive Link Label HIC Detection System

Link: biotynilierte anti-Kaninchen- und anti-Maus-Immunglobuline

Label: Streptavidin Alkaline Phosphatase

Substrat-Chromogen: Fast Red

Substrat-Puffer: Naphthol-Phosphat in Tris-Puffer

Die Schnitte wurden 15 Minuten mit Waschpuffer rehydriert. Dann wurden mit dem DakoPen die gewünschten Pellet-Schnitte mit dem DakoPen eingekreist. Für weitere 15 Minuten wurde ein Verdau mit 1 mg/ml Pepsin in 1 M Tris HCl (pH 2,0) bei Raumtemperatur angesetzt. Danach wurden die Schnitte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden für 20 Minuten mit 100µl Blockierungslösung unspezifische Bindungsstellen bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurden die Schnitte mit 100µl primärem Antikörper in einer Verdünnung von 1:700 (699µl Antikörper-Verdünnungspuffer + 1µl Col II) überschichtet. Eine Negativkontrolle hingegen wurde mit Maus-Serum in einer Verdünnung von 1: 462 überschichtet (1µl Maus-Serum + 461µl Antikörper-Verdünnungspuffer). Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte je 5 Minuten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden sie mit je 3 Tropfen Link in einer Verdünnung von 1:100 überschichtet und für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde Fast Red angesetzt. Dazu wurde eine halbe Tablette auf 2,5ml Puffer gelöst und eine 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden zur Blockierung der zelleigenen Phosphatase-Aktivität 3 Tropfen Levamisol zugegeben.

Die Schnitte wurden inzwischen dreimal je 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und dann mit je 3 Tropfen Label in einer Verdünnung von 1:100 überschichtet und für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Glycerol/Gelatine wurde bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt und die Wärmeplatte auf 60°C vorgewärmt. Die Schnitte wurden erneut dreimal für je 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde je 1-2 Tropfen Fast Red auf die Schnitte gegeben und 5 Minuten inkubiert. Dabei ließ sich eine Rotfärbung der positiven Zellen beobachten. Dann wurde Fast Red vorsichtig abgezogen und die Schnitte wurden dreimal mit destilliertem H₂O gewaschen. Sie wurden für 1 Minute im destillierten H₂O belassen. Anschließend wurden sie für 15 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt und dann wieder dreimal mit destilliertem H₂O gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für eine Minute in Leitungswasser gebläut. Zum Abschluss wurden die Schnitte unter dem Abzug auf der Wärmeplatte mit Glycerol/Gelatine unter Deckgläschen eingedeckt.

2.3.6 Apoptose-Färbung

Apoptotische Zellen können auf verschiedene Art und Weise von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Die hier verwendete Methode benutzt zwei Labels:

- Annexin-Cy3.18 (AnnCy3) bindet Phosphatidylserin, das sich in der äußeren Schicht der Plasmamembran von Zellen, die den apoptotischen Prozess beginnen, befindet. Diese Bindung äußert sich als rote Fluoreszenz.
- 6-Carboxyfluorescein-diacetat (6-CFDA) wird eingesetzt, um die Lebensfähigkeit zu bemessen. Wenn diese nicht fluoreszierende Verbindung in lebende Zellen eindringt, wird sie von den vorhandenen Esterasen hydrolysiert. Dabei entsteht dann die fluoreszierende Verbindung 6-Carbofluorescein (6-CF). Diese erscheint dann als grüne Fluoreszenz.

Es wurde das Apoptosis Detection Kit, Annexin V-CY3 von SIGMA benutzt.

Vorbereitung:

Zur Herstellung des 1x Binding Buffers (10mM HEPES, pH 7.5, enthält 140mM NaCl und 2,5mM CaCl₂) wurde der 10x Binding Buffer mit deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt.

Um 50mM 6-CFDA in Aceton herzustellen, wurden 2,32mg 6-Carboxyfluoresceindiacetat (6-CFDA) in 0,1ml Aceton gelöst. Die Lösung wurde in einem braunen Fläschchen lichtgeschützt aufbewahrt.

Für die Herstellung von 2ml Double Label Staining Solution (1µg/ml AnnCy3 und 500µM 6-CFDA in 1x Binding Buffer) wurden 20µl AnnCy3 (100µg/ml solution), 20µl 50mM 6-CFDA in Aceton und 200µl 10x Binding Buffer zu 1,76ml deionisiertem Wasser dazugegeben. Diese Lösung wurde in einem braunen Fläschchen lichtgeschützt aufbewahrt.

Durchführung:

Die Pellets wurden in je 1 Eppendorf-Cap überführt und anschließend 2 Mal mit PBS gewaschen. Je Pellet wurden dann 200µl Double Label Staining Solution hinzugegeben und 45 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Pellets je 5 Mal mit 1x Binding Buffer gewaschen. Danach wurden sie in der üblichen Prozedur in Paraffin eingebettet (s.o.). Dann wurden Paraffinschnitte hergestellt, die unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurden.

2.4 Protein-Analytik

2.4.1 Proteinreinigung mit Fc-Tag aus Baculovirus-infizierten Sf21-Zellen – Aufreinigung von WISP3

Affinitätschromatographie mit dem Hitrap Protein G Hp Kit

Benötigte Materialien:

- PBS
- Tris (3M, pH 8,0)
- Glycin (100mM, pH 2,5)
- 20% EtOH
- Spritzen (10ml)

-
- Eppendorf-Caps
 - Eis

Aufreinigung:

Ca. 5 Tage nach der Transfektion mit dem Baculovirus hatten die Zellen WISP3 in das Medium sezerniert, was an der Inhomogenität der Zellen (unterschiedliche Form und Größe – einige waren rund, andere ausgestülpt bzw. zitronenförmig) erkennbar war.

Das Medium wurde in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert. Dabei trennten sich nicht-adhärenente Zellen vom Medium. Der Überstand wurde in eine Becherglas überführt und auf Eis gelagert.

Die Aufreinigungssäule war mit EtOH (20%) gegen Austrocknung geschützt worden.

Der Spritzenadapter wurde auf die Säule geschraubt und der untere Stopfen abgeschraubt. Es wurden 10ml PBS mit der Spritze auf die Säule gegeben (Äquilibrieren der Säule). Der Überstand der Insektenzellen wurde auf die Säule gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass eine Geschwindigkeit von 2ml/min nicht überschritten wurde. Die Säule wurde mit 10ml PBS gewaschen, wobei die Säule aus der anderen Richtung befüllt wurde (hier war ein Adapter nötig). Dann wurde das Protein mit 10ml Glycin eluiert. Die Elution fand dabei durch die pH-Änderung statt. Dabei wurden 4-5 Fraktionen in Eppendorf-Caps gesammelt. In der ersten Fraktion wurden 500µl Eluat + 20µl Tris gesammelt, während in den weiteren Fraktionen 1ml Eluat + 40µl Tris gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden auf Eis gelagert. Der Rest des Glycins wurde daraufhin vollständig auf die Säule gegeben, um restliches Protein komplett von der Säule zu lösen. Dann wurde die Säule mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 6ml EtOH (20%) befüllt und wieder mit dem Stopfen verschlossen. Die einzelnen Fraktionen des Proteins mussten noch auf ihren pH-Wert überprüft werden (pH 7). Dazu wurde pH-Papier verwendet. War der pH zu hoch, musste Glycin zugegeben werden, bis der pH 7 erreicht hatte. War der pH zu hoch, musste Tris zugegeben werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode.

2.4.2 Mikro-Bradford-Bestimmung – Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Es wurden 2,5ml Roti-Quant (Bradford-Reagens) + 10ml H₂O bidest. gut miteinander vermischt. Je 500µl verdünntes Bradford-Reagens + 10µl Probe bzw. Standard, bzw. 100mM Glycin für den Blank-Wert wurden in eine Küvette pipettiert und kurz gevortext. Im Eppendorf-Biophotometer wurde das Programm „Mikro-Bradford“ ausgewählt.

Zunächst wurde der Nullwert geeicht. Dafür wurde die Küvette für den Blank-Wert (100mM Glycin) in das Photometer gestellt und die „Blank“-Taste gedrückt.

Um die Standards herzustellen, wurde 1mg BSA in 1 ml 100mM Glycin gelöst. Die Standardlösung 1mg/ml sollte eine OD von 0,66 haben (gemessen bei 280nm im Biophotometer). Daraus wurden 6 Standardlösungen zwischen 25-250µg/ml hergestellt:

- 25µg/ml: 5µl Standardlösung 1mg/ml + 195µl 100mM Glycin
- 50µg/ml: 10µl Standardlösung 1mg/ml + 190µl 100mM Glycin
- 75µg/ml: 15µl Standardlösung 1mg/ml + 185µl 100mM Glycin
- 100µg/ml: 20µl Standardlösung 1mg/ml + 180µl 100mM Glycin
- 150µg/ml: 30µl Standardlösung 1mg/ml + 170µl 100mM Glycin
- 250µg/ml: 50µl Standardlösung 1mg/ml + 150µl 100mM Glycin

Um eine Standard-Kurve zu erstellen, wurden die Standards jeweils zweimal gemessen (25-250µg/ml). Die Küvette mit dem Standard wurde in das Photometer gestellt und die „Standard“-Taste gedrückt. Die Messung wurde abgewartet und daraufhin erneut die „Standard“-Taste gedrückt. Nach der Messung wurde die Küvette entnommen und auf die gleiche Weise mit den anderen 5 Standards verfahren.

Um die Proben zu messen, wurde die Küvette mit der Probe in das Photometer gestellt und die „Sample“-Taste gedrückt. Nach der Messung wurde die Küvette wieder entnommen.

2.5 Molekularbiologie

2.5.1 RNA-Isolierung

Es wurde das Kit „NucleoSpin[®] RNA II“ verwendet.

Für die RNA-Isolierung wurden je 5 Pellets eines Ansatzes geerntet und in je ein 1,5ml-Eppendorf-Cap gegeben. Sie wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Eppendorf-Cap eine Lösung aus 350µl RA1 und 3,5µl Mercapto-EtOH angesetzt. Die Eppendorf-Caps wurden in einen Behälter mit flüssigem N₂ gegeben. Es wurde je ein Cap wieder herausgeholt. Die darin befindlichen Pellets wurden mit einem Plastikmörser zerkleinert. Dann wurde die Lösung aus RA1 und Mercapto-Ethanol dazugegeben. Um eine vollständige Zerkleinerung und Lösung der Pellets zu sichern, wurde jede Mischung außerdem durch eine Insulinspritze mit aufgesetzter langer Nadel auf und nieder gesogen.

Um die Viskosität zu reduzieren, wurde das jeweilige Lysat filtriert. Dazu wurde die violette Filter Unit in ein 1,5ml-Eppendorf-Cap platziert und die Lösung aufgegeben. Die Eppendorf-Caps wurden für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert.

Für die Vorbereitung der RNA-Bindung wurden die Filter Units verworfen und pro Eppendorf-Cap 350µl 70%iges Ethanol hinzugegeben. Die Mischungen wurde gevortext. Um die RNA zu binden, wurden die hellblauen Säulen in je ein Sammelgefäß platziert und das Lysat aufgegeben. Die Sammelgefäße wurden für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Säulen in neue Sammelgefäße platziert.

Für einen effektiveren DNase-Verdau wurden die Silica-Membranen entsalzt und getrocknet, indem je 350µl MDB (Membrane Desalting Buffer) zugegeben und für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert wurde. Um den DNase I-Verdau vorzubereiten, wurde die DNase gelöst. Dazu wurde der Inhalt eines DNase-Röhrchens in 540µl PCR-Wasser gelöst und dann in 50µl-Portionen portioniert. Es wurden je 10µl rekonstituierte DNase I zu 90µl DNase-Reaktionspuffer gegeben und gemischt. Dann wurden je 95µl DNase-Reaktionsmischung mittig auf die Silica-Membranen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Waschen und Trocknen der Silica-Membranen wurde in 3 Schritten durchgeführt. Zuerst wurde je 200µl Puffer RA2, der die DNase inaktiviert, auf die Säulen gegeben, die dann bei 8000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Die Säulen wurden in neue Sammelgefäße gegeben. Anschließend wurde je 600µl Puffer RA3 auf die Säulen gegeben, die dann erneut bei 8000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurde je 250µl Puffer RA3 auf die Säulen

gegeben, die dann bei 11000 x g für 2 Minuten zentrifugiert wurden. Die Säulen wurden anschließend in je ein Nuklease-freies 1,5ml-Eppendorf-Cap gegeben. Um die RNA zu eluieren, wurde je 40µl RNase-freies Wasser auf die Säulen gegeben, die dann für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert wurden. Die RNA wurde sofort auf Eis gelagert.

Um die RNA-Konzentration zu messen, wurden je 2µl RNA-Probe zu je 48µl HPLC-H₂O gegeben. Als Blank wurde 50µl HPLC-H₂O verwendet. Es wurden je 50µl Gesamtvolumen in eine UVette überführt. Die Konzentration wurde dann im Eppendorf-Biophotometer gemessen. Das A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Ein deutlich kleineres A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis würde eine mögliche Proteinkontamination anzeigen. Ein deutlich größeres A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis würde die Anwesenheit von degradierter RNA und/oder einen Überschuss an freien Nukleotiden anzeigen. Anschließend wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.5.2 cDNA-Synthese

Die RNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut. Für die cDNA-Synthese wurden pro Probe 400ng RNA benötigt. Deshalb wurde für jede Probe das benötigte Volumen an RNA-Suspension ausgerechnet. Es wurde autoklaviertes HPLC-H₂O in autoklavierte 1,5ml-Eppendorf-Caps vorgelegt, so dass zusammen mit dem Volumen der RNA-Suspension ein Endvolumen von 11µl erreicht wurde. Das benötigte Volumen der RNA-Suspension wurde dazupipettiert. Je Probe wurde außerdem 1µl (1µg/µl) Random-Hexamere dazugegeben. Das Endvolumen je Probe betrug also 12µl. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 70°C in den Heizblock gestellt und anschließend für 5 Minuten auf Eis. Danach wurden sie kurz anzentrifugiert.

Für die Herstellung des Master Mix sollte man immer eine zusätzliche Probe einkalkulieren, um eine genügende Menge zu erhalten. Je Probe benötigte man 4µl 5xReaction buffer, 1µl 10mM dNTPs, 2,75µl HPLC-H₂O und 0,25µl 200U/µl BioScript Reverse Transkriptase. Die Mischung wurde kurz gevortext. Je Probe wurden 8µl Master Mix zugegeben. Die Proben wurden 10 Minuten bei 25°C (bzw. Raumtemperatur) inkubiert. Anschließend wurden sie bei 42°C für 60 Minuten in den Heizblock gegeben. Danach wurden sie bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Dann

wurden die Proben kurz anzentrifugiert und je 30µl HPLC-H₂O dazugegeben. Das endgültige Volumen betrug dann 50µl. Die cDNA wurde dann bei -20°C gelagert.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vorbereitung der PCR mussten Primer-Lösungen aus der Primer-Stocklösung (100pmol/µl) in einer Verdünnung von 1:20 hergestellt werden. Dazu wurden jeweils 95µl HPLC-H₂O + 5µl Primer-Stocklösung gemischt.

Für alle Proben wurde ein gemeinsamer Master-Mix (Bioline) hergestellt:

H ₂ O	21,7µl (bzw. 21,5µl für Aggrecan- und Collagen2-PCR)
10x NH ₄ -Puffer	3µl
MgCl ₂ 50mM	1µl
dNTPs (10mM)	1µl
Primer forward (5pmol/µl)	1µl
Primer revers (5pmol/µl)	1µl
Taq-Polymerase (5000U/ml)	0,3µl (bzw. 0,5µl für Aggrecan- und Collagen II-PCR)

Das Endvolumen je Probe betrug dann 29µl.

Der Master-Mix wurde für alle Proben, eine Wasserprobe und eine zusätzliche Probe berechnet, um eine ausreichende Menge zu erhalten.

Die Taq-Polymerase wurde als letztes in den Master-Mix pipettiert und erst vor diesem Pipettier-Schritt in einem Kühlblock aus dem -20°C-Kühlschrank geholt. Nach dem Zugeben wurde sie sofort wieder bei -20°C gelagert.

Im Anschluss wurde der Master-Mix gevortext. Es wurden je 29µl Master-Mix in PCR-Tubes pipettiert. Dann wurde je 1µl cDNA zugegeben und die PCR-Tubes wurden gevortext. In die Wasserprobe wurde keine cDNA, sondern HPLC-H₂O dazugegeben. Um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen, wurden die PCR-Tubes für einige Sekunden in der Fugeone-Zentrifuge zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler. Dazu wurde zuerst das jeweilige PCR-Programm programmiert:

Programm für EF1α:

Step1	94°C	3 min
-------	------	-------

Step2	94°C	30 sec
Step3	55°C	1 min
Step4	72°C	1 min
Step5	Go to Step 2 for 23 times	
Step6	72°C	5 min
Step7	12°C	forever

Programm für Aggrecaan:

Step1	94°C	3 min
Step2	94°C	30 sec
Step3	54°C	1 min
Step4	72°C	1 min
Step5	Go to Step 2 for 44 times	
Step6	72°C	5 min
Step7	12°C	forever

Programm für Collagen II:

Step1	94°C	3 min
Step2	94°C	30 sec
Step3	58°C	1 min
Step4	72°C	1 min
Step5	Go to Step 2 for 44 times	
Step6	72°C	5 min
Step7	12°C	forever

Die PCR-Produkte wurden dann bei -20°C gelagert

2.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Benötigte Reagenzien:

10x TBE:

- 108g Trishydroxymethylaminomethan
- 55g Borsäure
- 9,05g EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat = $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)

Die Ingredienzien wurden mit destilliertem H₂O auf 1000ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und dann bei Raumtemperatur gelagert.

0,5x TBE:

Hierfür wurde der 10x TBE mit destilliertem H₂O 1:20 verdünnt.

10x Loading Dye:

- 3ml Glycerol (absolut)
- 2ml 0,5M EDTA pH 8,0
- 1ml 10% SDS
- 5mg Bromphenolblau SIGMA B 5525
- 5mg Xylen Cyanol SIGMA X 4126
- 4ml destilliertes H₂O

Es wurden 10ml Loading Dye angesetzt. Bromphenolblau und Xylen Cyanol wurden an der Feinwaage abgewogen. Alle Reagenzien wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und etwas gemischt. Als alles gelöst war, wurde die gesamte Lösung filtriert und in einem neuen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert.

100bpDNA-Ladder (Bereich zwischen 100-3000bp):

(Kit Firma PECLAB Biotechnologie GmbH)

- 100µl 100bpDNA-Leiter Plus (=1 Cap im Kit)
- 100µl Ladepuffer 6x (im Kit enthalten)
- 400µl EDTA 50nM pH 8,0

Nachdem alle Reagenzien gemischt wurden, wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

Agarosegelherstellung:

Für PCR-Produkte wie Aggrecan (392bp) und Collagen2 (374bp) wurde ein 2,0%iges Agarosegel benötigt. Für eine mittlere Kammer wurden 3,0g Agarose benötigt. Die Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Anschließend wurde mit 150ml 0,5x TBE-Puffer aufgefüllt. Die Mischung wurde in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt.

Die Gellösung wurde stehen gelassen, bis sie etwas abgekühlt war. Dann wurden 7,5µl Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung geschwenkt. Die Lösung wurde anschließend in eine Gelgießvorrichtung gegossen. Dann wurden die Kämme

eingesetzt. Das Gel musste mindestens 30 Minuten aushärten. Anschließend wurden die Käbme entfernt und das Gel in die Laufkammer gestellt. Es wurde 0,5x TBE-Puffer zugegeben bis das Gel knapp bedeckt war (der Laufpuffer konnte für maximal 3 Läufe benutzt werden).

Beladen des Gels:

In die erste Tasche wurden 5µl 100bpDNA-Ladder gegeben. In die anderen Taschen wurden je 10µl PCR-Produkt gegeben. Anschließend wurde das Gel bei 145V für circa 45 Minuten laufen gelassen. Wenn der blaue Farbstoff die mittlere Einkerbung erreicht hatte, wurde der Gellauf gestoppt.

Ausdrucken und Aufnahme des Gels:

Nach dem Gellauf wurde das Gel in die UV-Kammer gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen dem Gel und dem Untergrund keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Mit dem Programm BioCaptMW wurden unter UV-Belichtung Bilder des Gels aufgenommen.

3 Ergebnisse

Nach Vermehrung in Monolayer-Zellkulturen wurden je 3 Primärkulturen von dedifferenzierten Chondrozyten (Ch.Pat.1, Ch.Pat.2, KN350) und von mesenchymalen Stammzellen (MSC 302, MSC 317, MSC 322) zur weiteren Differenzierung in Form von Zellpellets in Multi-Well-Platten überführt. Die Zellpellets aus mesenchymalen Stammzellen bzw. Chondrozyten wurden nach Beendigung der 3-wöchigen Inkubationsphase bzw. in Zwischenschritten von 1 und 2 bzw. 1,5 Wochen per Histologie, Immunhistochemie und PCR auf die Bildung von knorpelspezifischen Produkten (Aggrecan und Collagen II) untersucht.

Es wurde jeweils ein Ansatz mit TGF- β , mit TGF- β und WISP-3 oder nur mit WISP-3 behandelt.

3.1 Dedifferenzierte Chondrozyten

Es wurden drei Primärkulturen von dedifferenzierten Chondrozyten (Ch.Pat.1, Ch.Pat.2, KN350) untersucht.

3.1.1 Histologie

In allen Kulturen der dedifferenzierten Chondrozyten fiel in den mit TGF- β und den mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellpellets eine Änderung der zuvor fibroblastoiden Morphologie zu einer typischen chondroiden Morphologie auf. Es zeigten sich abgerundete Zellen umgeben von Knorpelhöfen. In der Alcian-Färbung fiel die Blaufärbung der die Zellen umgebenden Matrix auf. Abb. 9 zeigt ein Zellpellet der Kultur Ch.Pat.1, das mit TGF- β und WISP-3 3 Wochen lang behandelt wurde.

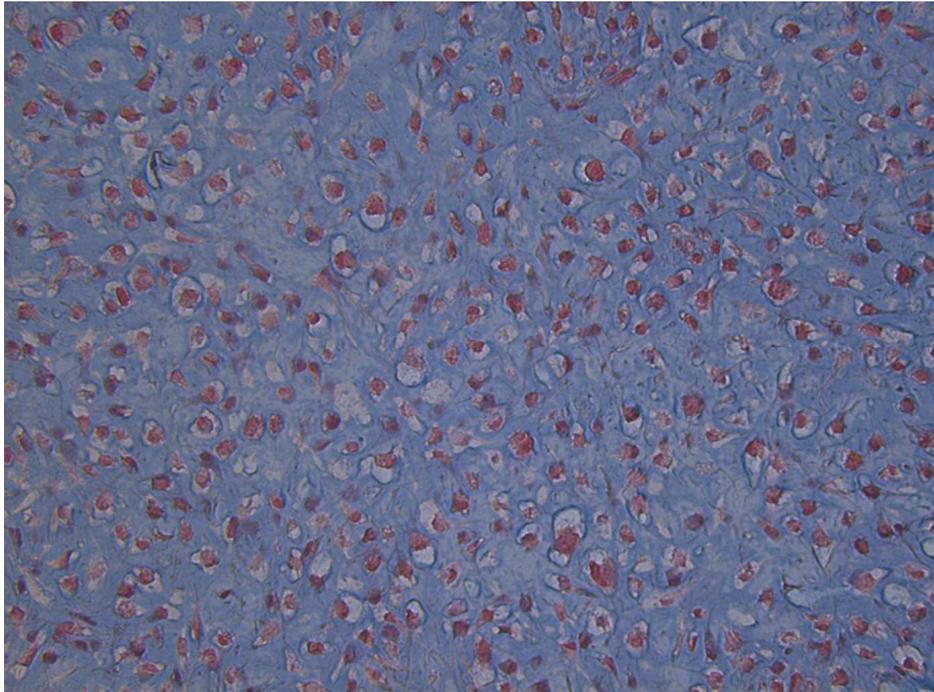


Abbildung 9 Ch.Pat.1 3W +TGF +WISP, Färbung: Alcian, Vergr. 20fach

Die Zellen wurden für 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium mit TGF- β und WISP-3 als Pelletkultur kultiviert. Die von den Chondrozyten gebildete extrazelluläre Matrix ist durch Alcianblau blau gefärbt. Die Zellkerne sind durch Kernechtrot rot gefärbt.

Das Kontrollzellpellet in Abb.10, das weder mit TGF- β noch mit WISP-3 behandelt wurde, zeigte noch immer die fibroblastoide Morphologie wie zu Beginn der Kultivierung. Es zeigte sich keine Blaufärbung.

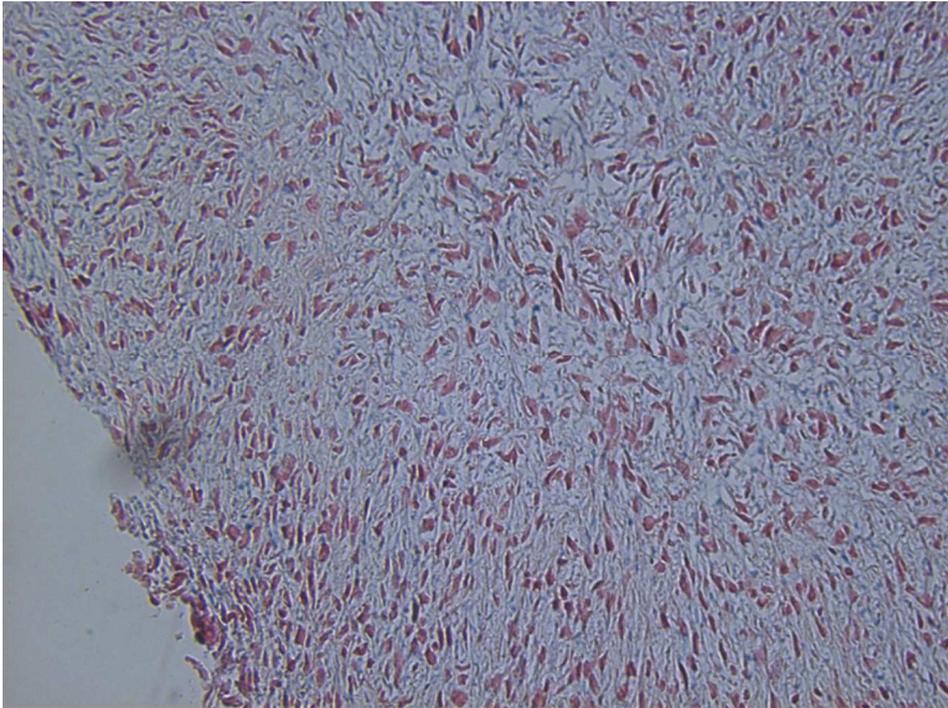


Abbildung 10 Ch.Pat.1 3W Kontrolle, Färbung: Alcian, Vergr. 20fach

Die Zellen wurden in Differenzierungsmedium ohne Zugabe von TGF- β oder WISP-3 für 3 Wochen als Pelletkultur kultiviert. Sie zeigen eine fibroblastischentypische Morphologie mit spindelförmigem Aussehen und länglichem Zellkern.

Nur in einer der drei Kulturen (KN350) zeigten sich auch bei der alleinigen Behandlung mit WISP-3 eine typische Änderung der Zellmorphologie und eine Blaufärbung der Matrix (siehe Abb.11).

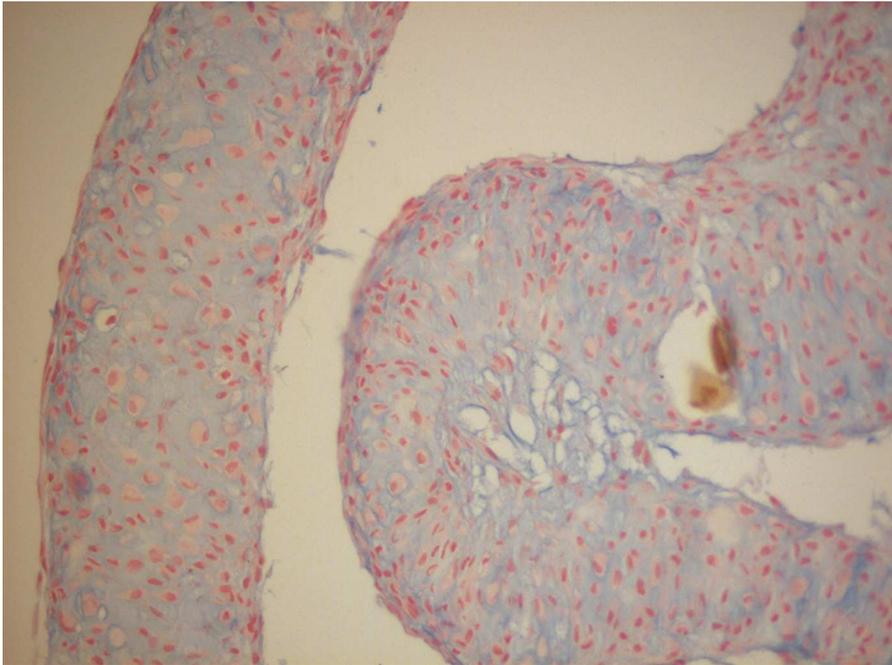


Abbildung 11 KN350 3W +WISP, Färbung: Alcian, Vergr. 20fach

Die Zellen wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von WISP-3 für 3 Wochen als Pelletkultur kultiviert. Unter dem Lichtmikroskop zeigt sich deutlich eine Blaufärbung der extrazellulären Matrix nach Färbung mit Alcian. Die Zellkerne erscheinen rot durch die Färbung mit Kernechtrot.

Allerdings zeigte sich in dieser Kultur, wie in Abb. 12 zu sehen ist, auch in den weder mit TGF- β noch mit WISP-3 behandelten Zellpellets eine Änderung der Zellmorphologie und eine Blaufärbung der Matrix.

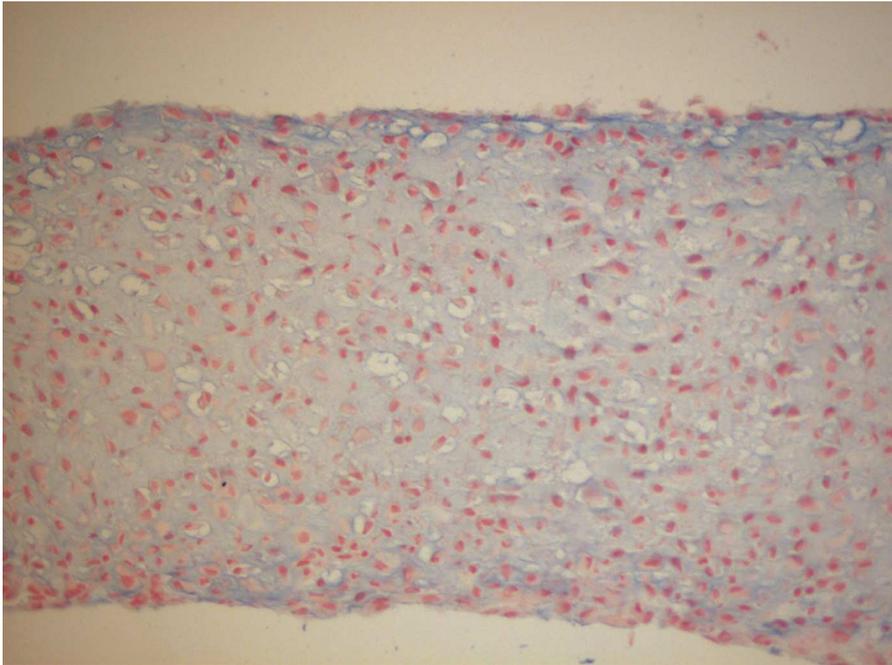


Abbildung 12 KN350 3W Kontrolle, Färbung: Alcian, Vergr. 20fach

Die Zellen wurden für 3 Wochen in Differenzierungsmedium ohne die Zugabe von TGF- β oder WISP-3 als Pelletkultur kultiviert. Auch hier zeigt sich eine Blaufärbung der extrazellulären Matrix in der Alcianblau-Färbung.

3.1.2 Immunhistochemie

Wie in Abb. 13 erkennbar ist, ließ sich in der immunzytochemischen Färbung bei den mit TGF- β und bei den mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellpellets eine Rotfärbung beobachten, die auf die Bildung von Collagen II hinweist.

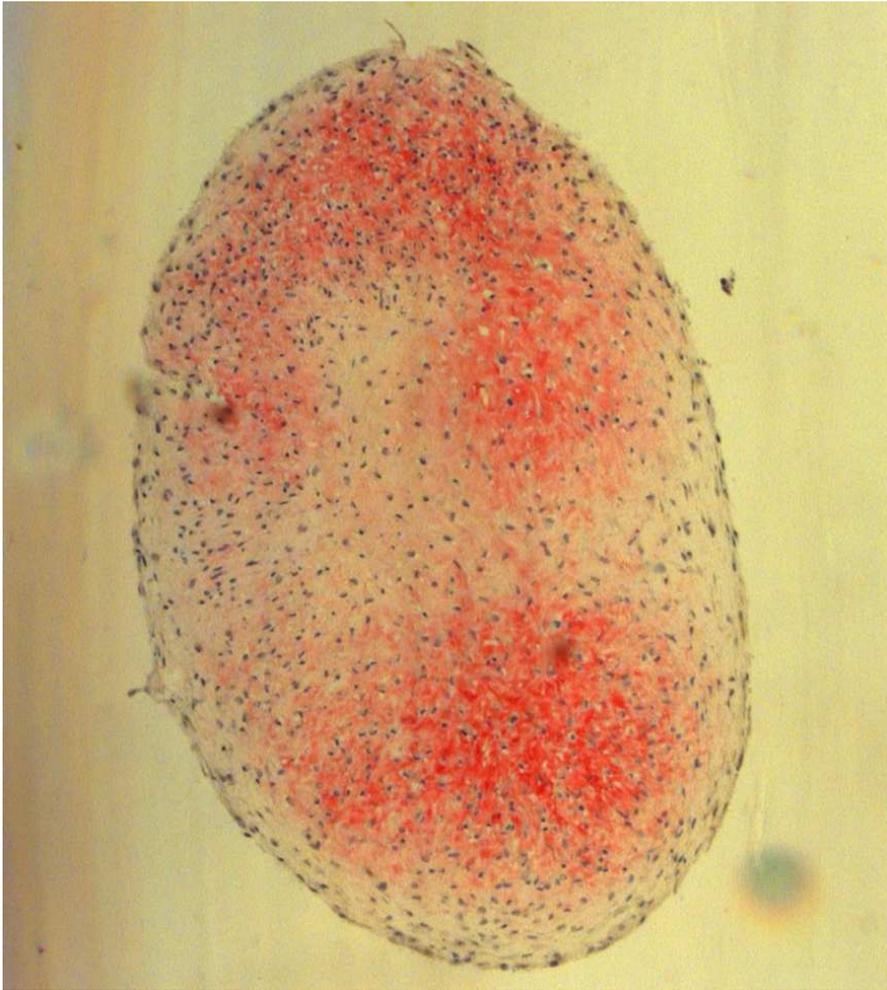


Abbildung 13 Ch.Pat.1 3W +TGF, Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung, Vergr. 5fach
Die Zellen wurden für 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von TGF- β als Pelletkultur kultiviert. Sie zeigen eine knorpeltypische Morphologie mit abgerundeten Zellen in Knorpelhöfen. Die extrazelluläre Matrix ist rot gefärbt durch die Collagen Typ II-Antikörper-Färbung.

Nur in einer der drei Kulturen (KN350) war auch bei den nur mit WISP-3 behandelten Zellpellets eine leichte positive Färbung zu erkennen (siehe Abb. 14).

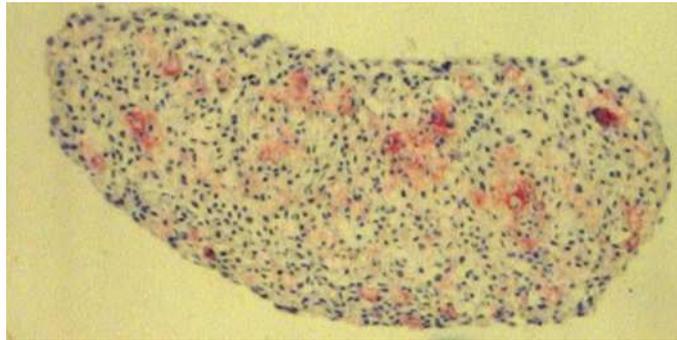


Abbildung 14 KN350 1,5W +WISP-3, Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung, Vergr. 5fach
Die Zellen wurden für 1,5 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von WISP-3 als Pelletkultur kultiviert. Sie zeigen eine knorpeltypische Morphologie und eine leichte Rotfärbung der extrazellulären Matrix durch die Collagen Typ II-Antikörper-Färbung.

Diese leichte positive Färbung zeigte sich allerdings auch in dem Zellpellet in Abb. 15, das weder mit TGF- β noch mit WISP-3 behandelt wurde.



Abbildung 15 KN350 1,5W Kontrolle, Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung, Vergr. 5fach
Die Zellen wurden für 1,5 Wochen in Differenzierungsmedium ohne Zugabe von TGF- β oder WISP-3 als Pelletkultur kultiviert. Sie zeigen eine knorpeltypische Morphologie und die extrazelluläre Matrix ist durch die Collagen Typ II-Antikörper-Färbung leicht rot gefärbt.

3.1.3 Apoptose-Färbung

Bei einer der drei Kulturen (KN350) wurde auch die Apoptose-Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zellen bei allen Arten der Behandlung und zu allen Zeitpunkten apoptotisch waren (siehe Abb. 16).

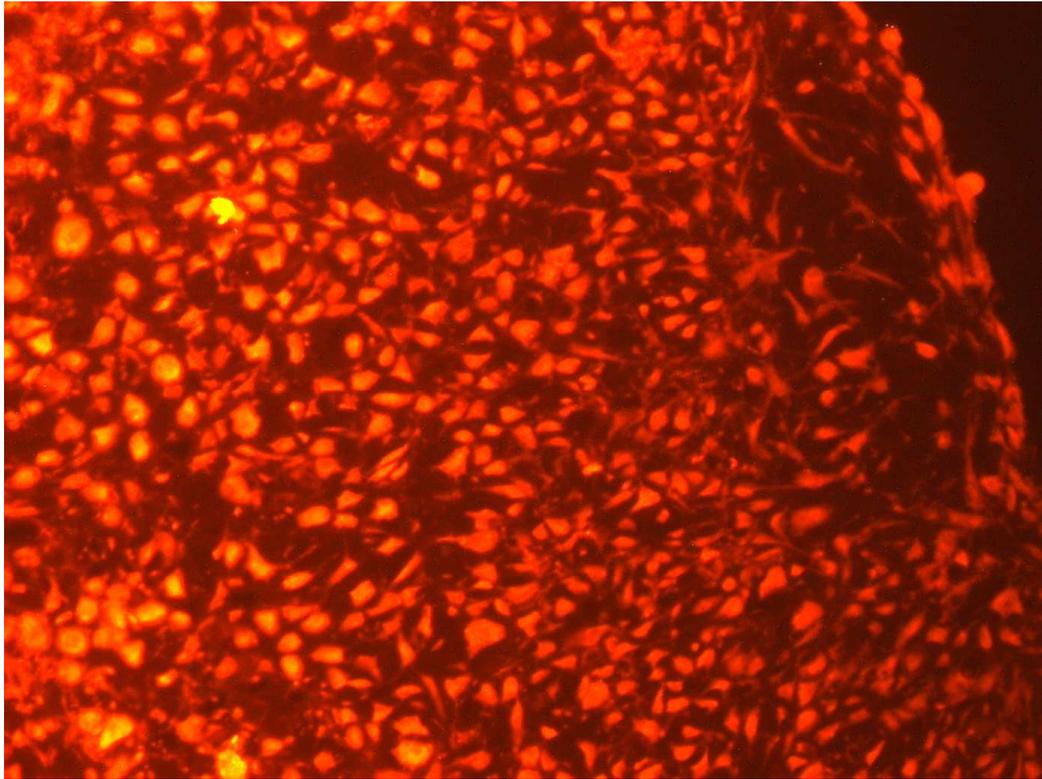


Abbildung 16 KN350 3W +TGF+WISP, Färbung: Apoptose-Färbung Annexin V-CY3, Vergr. 20fach
Die Zellen wurden für 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von TGF- β und WISP-3 als Pelletkultur kultiviert. In der Apoptose-Färbung zeigt sich eine rote Fluoreszenz durch die Bindung von Annexin-Cy3.18 an Phosphatidylserin, das sich in der äußeren Schicht der Plasmamembran von Zellen, die den apoptotischen Prozess beginnen, befindet.

3.1.4 PCR

In der PCR ließ sich bei allen drei Kulturen eine Aggrecan- und eine Collagen II-Produktion nachweisen, was beispielhaft an den Kulturen Ch.Pat1. und Ch.Pat.2 gezeigt werden soll.

3.1.4.1 Aggrecan

In der Kultur Ch.Pat.1 wurden jeweils fünf Replikate (Zellpellets) pro Ansatz ausgewertet. Die Aggrecan-Produktion war am Tag 0 und in den Zellpellets, die mit TGF- β oder mit TGF- β und WISP-3 behandelt worden waren, am stärksten (siehe Abb. 17 und 18).

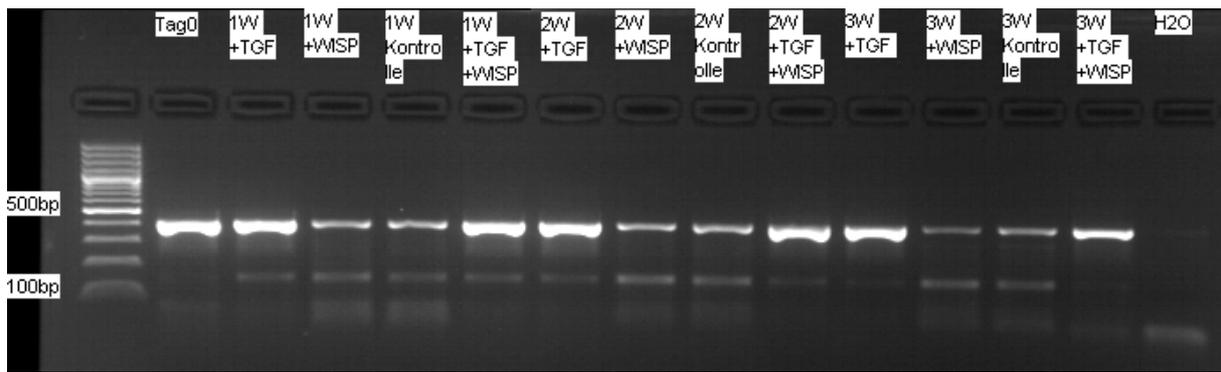


Abbildung 17 Ch.Pat.1 PCR auf Aggrecan.

Die Aggrecan-Produktion der Chondrozyten wurde mittels PCR und Gel-Elektrophorese gemessen. Aggrecan hat eine Größe von 392 bp. Die Chondrozyten produzierten zu allen Zeitpunkten der Kultivierung Aggrecan, wobei die Banden im Verlauf eine variable Intensität zeigen. Chondrozyten, die sowohl mit TGF- β als auch mit WISP-3 behandelt wurden, zeigten eine stärkere und zunehmende Aggrecan-Produktion als die Chondrozyten, die nur mit TGF- β oder nur mit WISP-3 behandelt wurden. Allerdings sank die Produktion im Verlauf wieder ab.

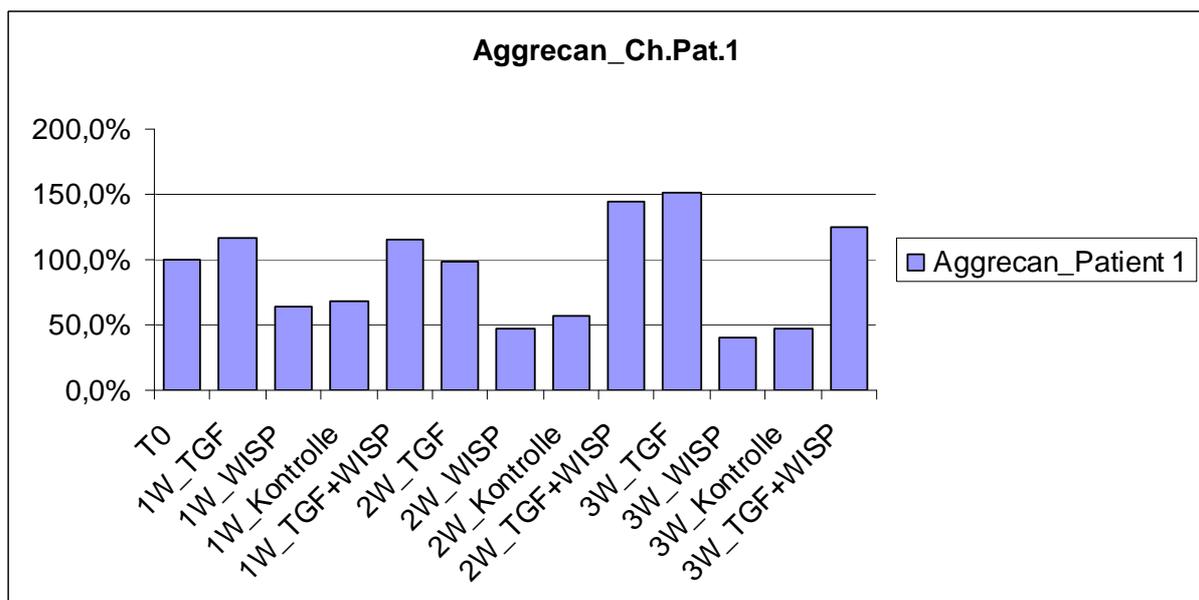


Abbildung 18 Auswertung Ch.Pat.1 PCR auf Aggrecan.

Die Auswertung der Aggrecan-Produktion der Chondrozyten im Verlauf zeigt eine verstärkte Aggrecan-Produktion bei mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen mit einem Maximum nach 2 Wochen. Die alleinige Behandlung mit WISP-3 führte zu einer abnehmenden Aggrecan-Produktion.

In der Kultur Ch.Pat.2 wurden jeweils fünf (1,5W) bzw. sieben (3W) Replikate (Zellpellets) pro Ansatz ausgewertet. Die Aggrecan-Produktion war am Tag 0 und in

den Zellpellets, die nur mit TGF- β behandelt worden waren, am größten (siehe Abb. 19 und 20).

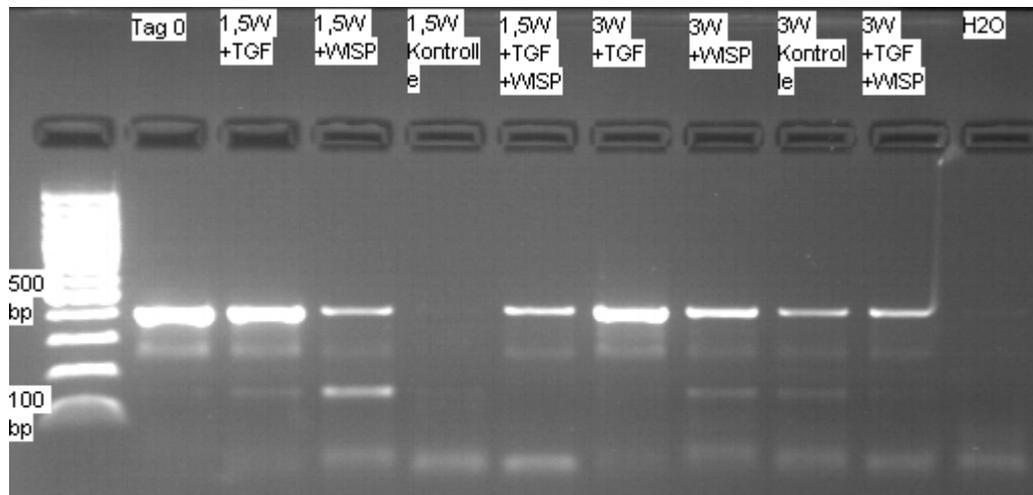


Abbildung 19 Ch.Pat.2 PCR auf Aggrecan..

Die Aggrecan-Produktion wurde mittels PCR und Gel-Elektrophorese gemessen. Aggrecan hat eine Größe von 392 bp. Die Intensität der Banden war in mit TGF- β behandelten Chondrozyten am höchsten und nahm im Verlauf zu. Chondrozyten, die mit TGF- β und WISP-3 behandelt wurden, zeigten eine stärkere Intensität der Banden als Chondrozyten, die nur mit WISP-3 behandelt wurden.

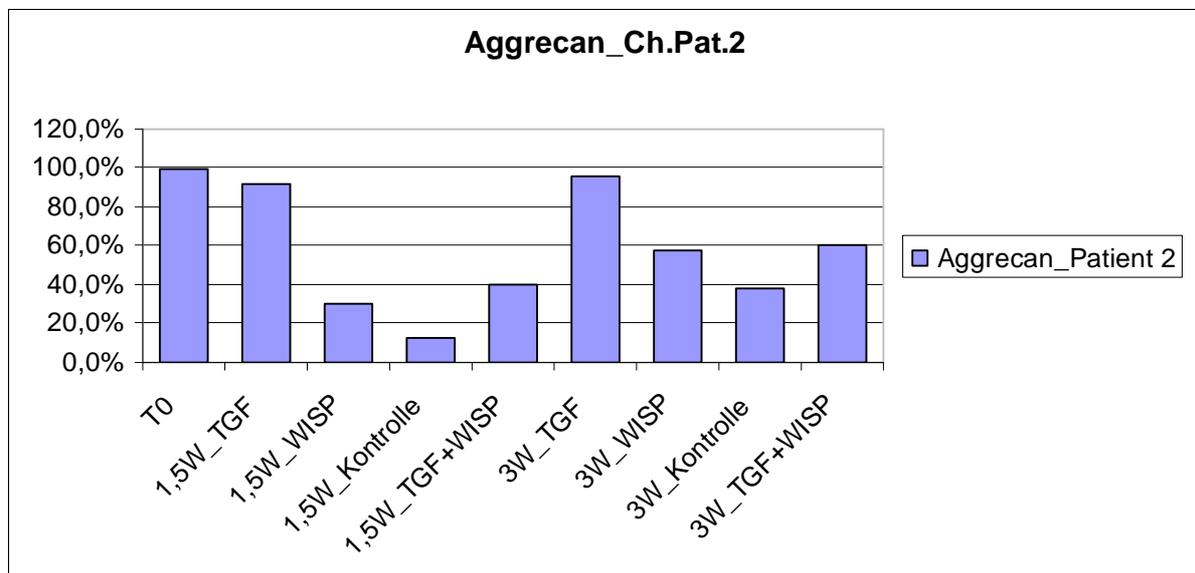


Abbildung 20 Auswertung Ch.Pat.2 PCR auf Aggrecan.

Die Auswertung der Aggrecan-Produktion im Verlauf zeigt die höchste Aggrecan-Produktion bei mit TGF- β behandelten Chondrozyten. Mit TGF- β und WISP-3 behandelte Chondrozyten zeigten eine höhere Aggrecan-Produktion als nur mit WISP-3 behandelte Chondrozyten. Nach einem Nadir bei 1,5 Wochen stieg die Aggrecan-Produktion nach 3 Wochen in allen Kulturen gleichermaßen wieder an.

3.1.4.2 Collagen II

In Abb. 21 und Abb. 22 zeigt sich, dass in der Collagen II-PCR nur die Zellpellets der Kultur Ch.Pat.1, die mit TGF- β oder mit TGF- β und WISP-3 behandelt worden waren, Collagen II produzierten. Die Collagen II-Produktion nahm dabei mit der Zeit stark zu. Es wurden jeweils 5 Replikate (Zellpellets) pro Ansatz ausgewertet.

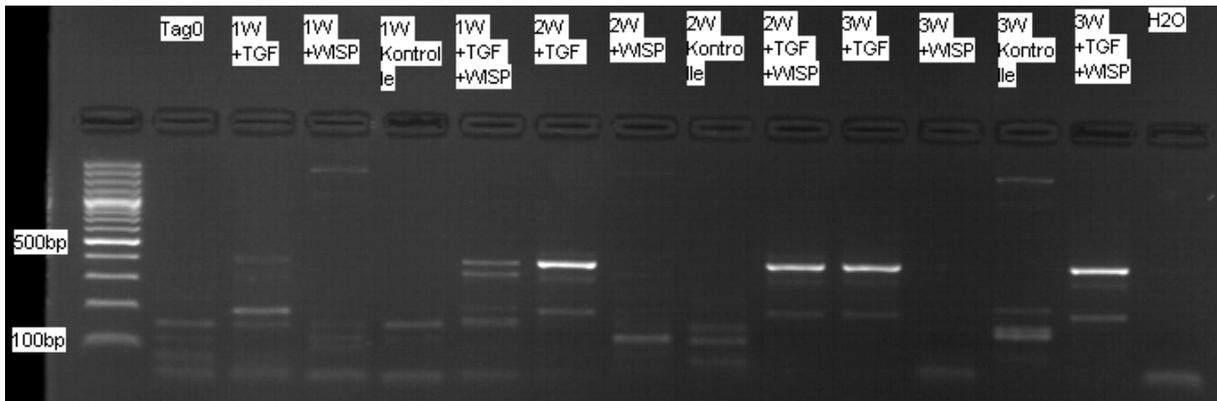


Abbildung 21 Ch.Pat.1 PCR auf Collagen II.

Mittels PCR und Gel-Elektrophorese wurde die Collagen-II-Produktion der Chondrozyten gemessen. Collagen II hat eine Größe von 374 bp. Die Intensität der Banden war bei mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen am höchsten und nahm im Lauf von 3 Wochen stetig zu. Die alleinige Behandlung mit WISP-3 führte zu keiner messbaren Intensitätssteigerung der Banden.

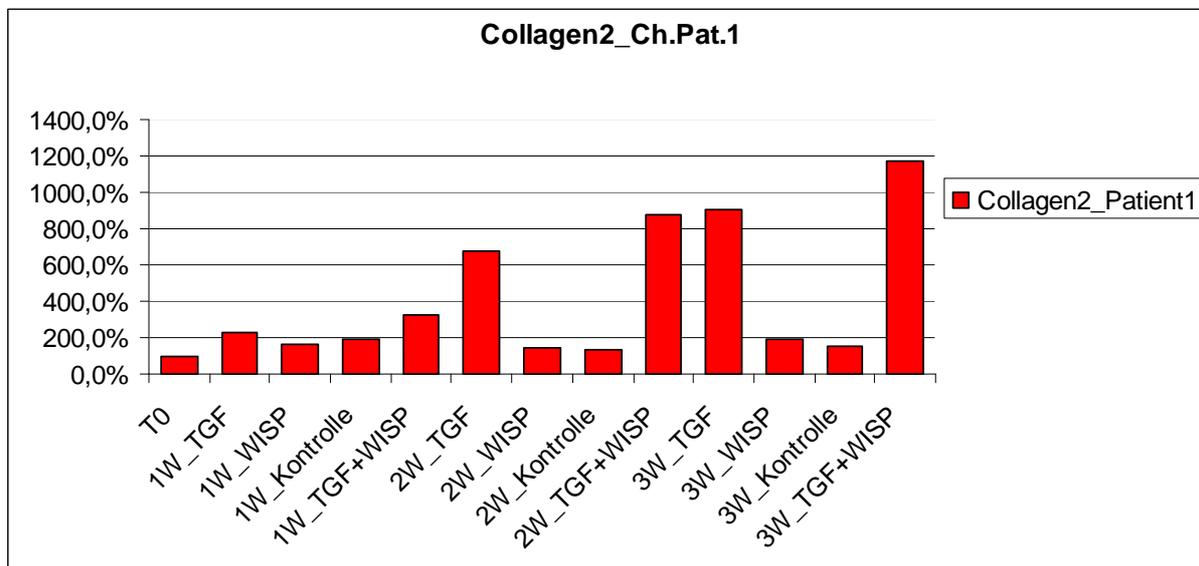


Abbildung 22 Auswertung Ch.Pat.1 PCR auf Collagen II.

Die Auswertung der Collagen II-Produktion zeigt die höchste Produktion bei mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen, wobei die Produktion im Verlauf stetig anstieg (bis auf das 6-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe). Die nur mit WISP-3 behandelten Zellen zeigten keine nennenswerte Steigerung der Collagen II-Produktion.

In den Abb. 23 und 24 zeigt sich, dass nur die Zellpellets der Kultur Ch.Pat.2, die mit TGF- β oder mit TGF- β und WISP-3 behandelt wurden, eine Collagen II-Produktion aufwiesen. Dabei war die Collagen II-Produktion in den mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellpellets etwas höher als in den nur mit TGF- β behandelten Zellpellets. Es wurden jeweils fünf (1,5W) bzw. sieben (3W) Replikate (Zellpellets) pro Ansatz ausgewertet.

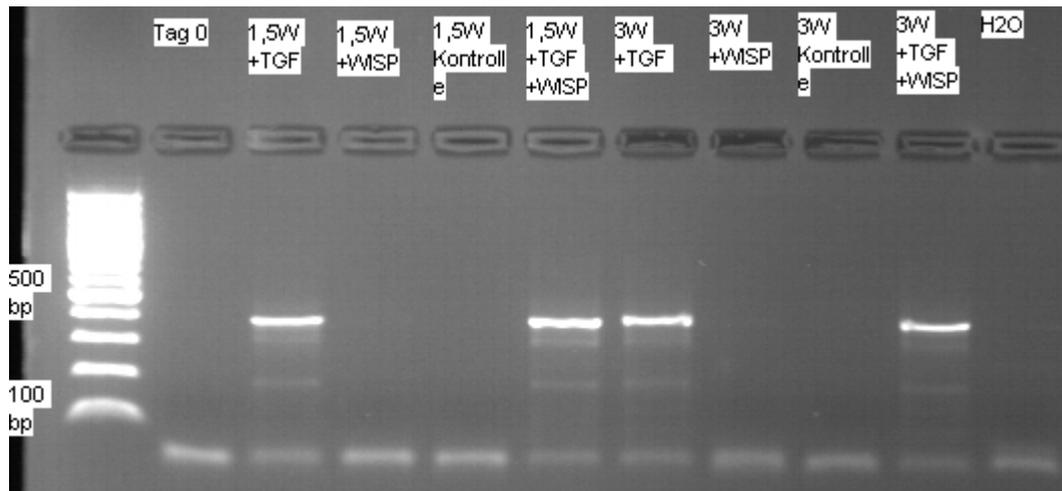


Abbildung 23 Ch.Pat.2 PCR auf Collagen II.

Mittels PCR und Gel-Elektrophorese wurde die Collagen II-Produktion gemessen. Collagen II hat eine Größe von 374 bp. Die stärkste Intensität der Banden wiesen die mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen auf.

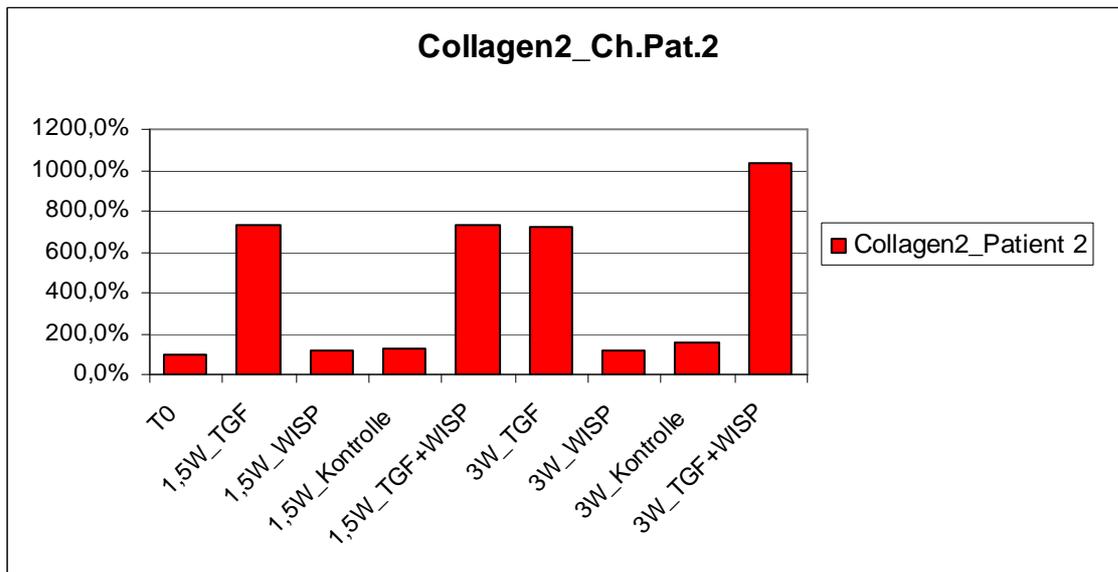


Abbildung 24 Auswertung Ch.Pat.2 PCR auf Collagen II.

Die Auswertung der Collagen II-Produktion zeigt die höchste Produktion bei mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen, wobei die Produktion im Verlauf zunahm. Die allein mit WISP-3 behandelten Zellen zeigten keine nennenswerte Steigerung der Collagen II-Produktion.

3.2 Mesenchymale Stammzellen

Es wurden drei Primärkulturen untersucht.

3.2.1 Histologie

Weder in der HE-Färbung noch in der Alcian-Färbung ließ sich eine Differenzierung zu Knorpelgewebe nachweisen. Die mesenchymalen Stammzellen zeigten in allen Ansätzen dieselbe fibroblastoide Morphologie, die sie auch vor der Kultivierung in Pelletkulturen besaßen. In der Alcian-Färbung fiel keine Blaufärbung auf, die auf stark saure negativ geladene Proteoglykane (z.B. Aggrecan) hingewiesen hätte.

3.2.2 Immunhistochemie

In der immunzytochemischen Färbung konnte in keiner der drei mesenchymalen Stammzellkulturen Collagen II nachgewiesen werden.

3.2.3 PCR

In der PCR konnte bei einer der drei Kulturen eine Aggrecan-Produktion nachgewiesen werden. Die Aggrecan-Produktion war in der ersten Woche der Kultivierung in Zellpellets stärker als in den darauffolgenden zwei Wochen.

Es wurden jeweils fünf (1W, 2W) bzw. sieben (3W) Replikate (Zellpellets) pro Ansatz ausgewertet.

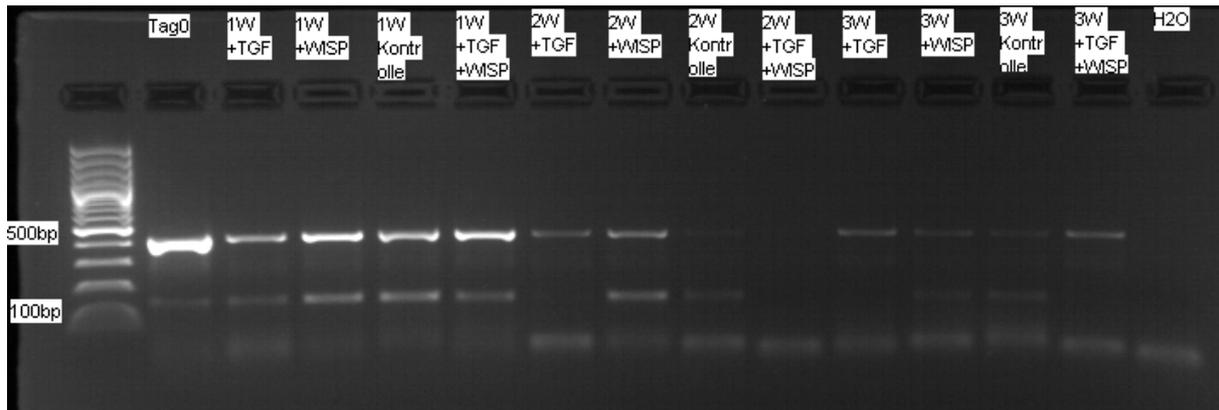


Abbildung 25 MSC322 PCR auf Aggrecan.

Die Aggrecan-Produktion der mesenchymalen Stammzellen wurde mittels PCR und Gel-Elektrophorese gemessen. Aggrecan hat eine Größe von 392bp. Die Intensität der Banden nimmt im Verlauf immer weiter ab, wobei die stärkste Banden-Intensität nach 1 Woche in den mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen zu finden ist.

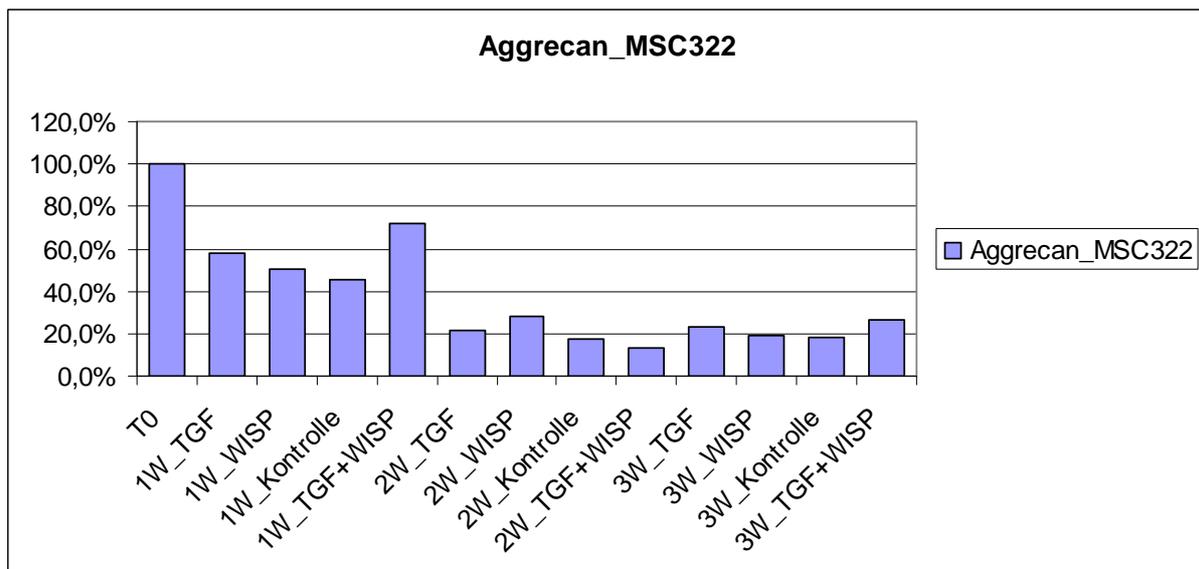


Abbildung 26 Auswertung MSC322 PCR auf Aggrecan.

Die Auswertung der Aggrecan-Produktion zeigt, dass die höchste Produktion in mit TGF- β und WISP-3 behandelten Zellen stattfand. Zellen, die nur mit WISP-3 behandelt wurden, zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöhte Produktion. Insgesamt nahm die Aggrecan-Produktion im Verlauf stetig ab.

Es zeigte sich, dass eine Kombination von TGF- β und WISP-3 zu einer stärkeren Aggrecan-Produktion führte als TGF- β oder WISP-3 alleine.
Es konnte keine Collagen II-Produktion nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Arthrose ist eine Volkskrankheit, die bisher rein symptomatisch sowohl konservativ als auch operativ therapiert wird. Die bisher vorhandenen Therapiemöglichkeiten haben jedoch jeweils ein gewisses Nebenwirkungsspektrum und sind daher nicht für jeden Patienten gleichwohl einsetzbar. Dies gilt vor allem, da die Arthrose mit zunehmendem Alter häufiger auftritt und ältere Patienten auch häufiger unter Nebenerkrankungen wie kardialen, renalen oder gastrointestinalen Problemen leiden. Es wird daher weiter nach nebenwirkungsarmen Therapiealternativen gesucht.

Seit einigen Jahren rückt WISP-3, ein Mitglied der CCN-Familie, in den Fokus. Die positive Wirkung von WISP-3 auf das Knorpelwachstum wurde an der Progressiven Pseudorheumatoiden Dysplasie (PPD) erkannt. Bei der PPD führen Mutationen von WISP-3 zu Knorpelverlust und Degradation, was bei betroffenen Patienten bereits in der dritten Lebensdekade einen Gelenkersatz notwendig machen kann.

Die genauen Wirkmechanismen von WISP-3 sind Gegenstand der aktuellen Forschung. In unserer Arbeit wurde die Wirkung von WISP-3 auf dedifferenzierte Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen untersucht. Typischerweise setzt sich Knorpel aus Chondronen und dem sie umgebenden Interterritorium zusammen. Die Chondrone bestehen aus rundlichen Chondrozyten, die einzeln oder gruppiert in Lakunen liegen, und den Knorpelhöfen. Dabei werden die Lakunen von einer Knorpelkapsel umgeben. Die Matrix des Interterritoriums besteht vor allem aus Proteoglykanen wie Aggrecan, Collagenfibrillen aus Typ-II-Collagen und Hyaluronsäure.

In unserer Arbeit legten wir nun Wert auf die morphologische Beschaffenheit und die Produktion von Aggrecan und Collagen II als Marker für eine normale Knorpelhomöostase.

Sowohl die dedifferenzierten Chondrozyten als auch die mesenchymalen Stammzellen wurden zuerst in Monolayer-Zellkulturen angelegt. Die Differenzierung erfolgte in Pelletkulturen unter Zugabe von verschiedenen Mediumzusätzen wie ITS, Ascorbinsäure, Dexamethason und Penicillin/Streptokinase als Antibiotikaphylaxe. ITS hat eine proliferative Wirkung, Ascorbinsäure und Dexamethason induzieren die Synthese der Matrixproteine.

Zuerst wurden die dedifferenzierten Chondrozyten aus den drei Primärkulturen untersucht. Dedifferenzierte Chondrozyten haben ein fibroblastoides Aussehen. Nach der Behandlung mit TGF- β und WISP-3 zeigte sich morphologisch in der Alcianblau-Färbung eindeutig eine Redifferenzierung zu typischem Knorpelgewebe. Auch immunhistochemisch konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eindeutig die Bildung von Collagen II nachgewiesen werden. Vor allem bei der Kultur KN350 zeigte sich nach Behandlung mit TGF- β und WISP-3 eine eindruckliche Redifferenzierung mit eindeutig knorpelartiger Morphologie, allerdings auch in der Kontrollgruppe. Möglicherweise ist dieser Effekt auf das jüngere Alter des Spenders zurückzuführen.

Per PCR wurden die dedifferenzierten Chondrozyten nun auf die Bildung von Aggrecan und Collagen II untersucht. Sowohl für Aggrecan als auch für Collagen II zeigte sich die höchste Produktion bei der Behandlung mit TGF- β und WISP-3. Die alleinige Behandlung mit WISP-3 führte zwar ebenfalls zu einer vermehrten Stimulation, aber bei weitem nicht so stark wie in der Kombination mit TGF- β . Die Wirkungsverstärkung durch einen Wachstumsfaktor scheint also sinnvoll zu sein. Die Aggrecan-Produktion nahm nach einem Peak nach 1,5 bis 2 Wochen dann wieder ab, während die Collagen II-Produktion weiter stieg. Da Aggrecan eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als Collagen II von nur Tagen bis wenigen Wochen aufweist, ist dieses Verteilungsmuster nachvollziehbar.

Wir untersuchten außerdem die Wirkung von WISP-3 auf mesenchymale Stammzellen im selben Setting. Dabei zeigte sich allerdings morphologisch keine Entwicklung zu knorpeltypischem Gewebe. In der PCR konnte man allgemein eine Abnahme der Aggrecan-Produktion im zeitlichen Verlauf feststellen, auch wenn die Aggrecan-Konzentration bei mit TGF- β und WISP-3 behandelten mesenchymalen Stammzellen im Vergleich höher war als bei nur mit TGF- β oder WISP-3 behandelten mesenchymalen Stammzellen oder in der Kontrollgruppe. Eine Collagen II-Produktion konnte bei keiner der mesenchymalen Stammzellkulturen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den dedifferenzierten Chondrozyten konnte also bei den mesenchymalen Stammzellen keine suffiziente chondrogene Differenzierung zu hyalinem Knorpelgewebe eingeleitet werden. Möglicherweise ist die Pelletkultur für diese Zielsetzung nicht geeignet und es müssen andere Kultivierungsmethoden erprobt werden. Eine andere Ursache könnte in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien

der aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen liegen. Eventuell reagieren die Zellen somit unterschiedlich auf die zugegebenen Wachstumsfaktoren und eine homogene Differenzierung wird dadurch erschwert. Auch die Anzahl der Passagen und der Ursprung der Zellen spielt möglicherweise eine Rolle.

WISP-3 reguliert die Knorpelhomöostase und Integrität, wobei die genauen Wirkmechanismen noch nicht endgültig geklärt sind. Bisher konnte z.B. durch Sen et al. dargelegt werden, dass WISP-3 durch Integrine einen positiven Effekt auf Transkriptionsfaktoren aus der SOX-Familie hat, wodurch die Produktion von Aggrecan und Collagen II gesteigert wird. Die Transkriptionsfaktoren aus der SOX-Familie sind somit essentiell für die chondrogene Differenzierung und die Skelettentwicklung. Ein weiterer Gesichtspunkt stellt der Effekt auf Wachstumsfaktoren wie IGF-1 dar. Die Wirkung von IGF-1 wird durch WISP-3 erhöht. WISP-3 führt damit durch IGF-1 zu einer Hochregulation der Knorpelmatrix-Synthese.⁹⁰

Des Weiteren wurde durch Baker et al. festgestellt, dass WISP-3 die Knorpelhomöostase auch durch die Wirkung auf Proteinase beeinflusst. Unter anderem wird die Proteinase ADAMTS-5 durch WISP-3 runterreguliert. Da ADAMTS-5 eine potente Aggrecanase darstellt und somit zum Zerfall der Knorpelmatrix führt, wird durch die Regulation durch WISP-3 der vorzeitige Abbau vermindert. ADAMTS-5 konnte vor allem in der Entzündungssituation nachgewiesen werden. Eine weitere Proteinase, die durch WISP-3 beeinflusst wird, ist das MMP-10. Bei verstärkter Anwesenheit steigt auch die Expression von MMP-10. MMP-10 führt zur Remodellierung der Knorpelmatrix und zur Wundheilung durch Chondrozytenmigration.⁶

WISP-3 stellt also einen regulierenden Faktor in der Knorpelhomöostase dar, indem es verschiedenste Wirkmechanismen beeinflusst, z.B. durch Minderung des vorzeitigen Knorpelabbaus und durch indirekte Steigerung der Aggrecan- und Collagen II-Produktion. Diese Wirkmechanismen sollten weiter erforscht werden, um das therapeutische Potential dieses Proteins und seiner Signalwege ausnutzen zu können. Das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren scheint für die optimale Wirkung sinnvoll zu sein, wie sich auch in unseren Kulturen zeigte.

Die weitere Erforschung zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knorpelgewebe sollte weiter vorangetrieben werden. WISP-3 könnte auch hier eine Rolle spielen, wobei die optimalen Wirkbedingungen in diesem Setting noch nicht erreicht sind.

5 Zusammenfassung

Degenerative Gelenkerkrankungen (Arthrosen) sind einige der häufigsten Ursachen für eine Vorstellung und Beratung in der allgemeinmedizinischen Praxis. Der Großteil der über 65-jährigen ist davon betroffen, wenn auch die Symptome in ihrer Ausprägung stark variieren können. Eine ursächliche Therapie ist bisher nicht bekannt. Es wird symptomatisch behandelt und versucht, die Symptome zu lindern und den Progress der Erkrankung zu verlangsamen. Dabei entstehen dem Gesundheitssystem durch die hohe Prävalenz nicht unerhebliche Kosten für Medikamente, Physiotherapie, Operationen und Reha-Aufenthalte.

Arthrosen beruhen auf Knorpelschädigungen, die ohne Therapie immer weiter fortschreiten können und zu Schmerzen, Bewegungseinschränkung und Verformung des Gelenks führen können. Diese Knorpelschädigungen können auf verschiedenen Ursachen beruhen wie z.B. zu hoher Belastung (bei Adipositas), Traumata oder Erkrankungen des Skelettsystems. Neue Behandlungsansätze werden mit zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung immer wichtiger werden.

Ein Ansatzpunkt ist die weitere Erforschung von Proteinen wie z.B. WISP-3, die einen positiven Effekt auf die Knorpelhomöostase bewirken. Die Bedeutung von WISP-3 fiel bei der Erforschung der Progressiven Pseudorheumatoiden Dysplasie auf, einer seltenen Gelenkerkrankung, die v.a. bei Kindern auftritt. Dabei treten auf Grund von Mutationen von WISP-3 Störungen in der Knorpelhomöostase und Gelenkarchitektur auf, die sogar eine Therapie mittels Gelenkersatz notwendig machen können.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass WISP-3 in Verbindung mit Wachstumsfaktoren eine positive Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten aufweist. Somit werden neue Forschungsansätze in der Arthrotherapie aufgezeigt. Für die weitere Forschung kann auch auf mesenchymale Stammzellen zurückgegriffen werden, die vielversprechende Aussichten besonders im Tissue Engineering bieten.

Für die gesamte CCN-Familie ergeben sich noch weitere vielfältige Forschungsmöglichkeiten, wie z.B. in der Therapie von Mamma-, Gebärmutter- oder Nierenzellkarzinomen.

6 Literatur

1. Aboulghassem S., Frønsdal K., Haug T., Reinholt F.P., Brinchmann J.E.: In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression and transcriptome stability; *Stem Cells*, 2005 Oct; 23 (9):1357-1366
2. Ahmed N., Taylor D.W., Wunder J., Nagy A., Gross A.E., Kandel R.A.: Passaged human chondrocytes accumulate extracellular matrix when induced by bovine chondrocytes; *J Tissue Eng Regen Med*, 2010 Mar; 4 (3): 233-41
3. Albrecht C., Schlegel W., Bartko P., Eckl P., Jagersberger T., Vécsei V., Marlovits S.: Changes in the endogenous BMP expression during redifferentiation of chondrocytes in 3D cultures; *Int J Mol Med*, 2010 Sep; 26 (3): 317-23
4. Alvarez-Soria M.A., Herrero-Beaumont G., Sánchez-Pernaute O., Bellido M., Largo R.: Diacerein has a weak effect on the catabolic pathway of human osteoarthritis synovial fibroblast - comparison to its effects on osteoarthritis chondrocytes; *Rheumatology (Oxford)*, 2008 May; 47 (5): 627-633
5. Ando K., Isoya E., Kubo M., Mimura T., Shioji S., Ueyama H., Matsusue Y.: Effect of dynamic compressive loading and its combination with a growth factor on the chondrocytic phenotype of 3-dimensional scaffold-embedded chondrocytes; *Acta Orthop*, 2009 Dec; 80 (6): 724-33
6. Baker N., Sharpe P., Culley K., Otero M., Bevan D., Newham P., Barker W., Clements K.M., Langham C.J., Goldring M.B., Gavrilovic J.: Dual Regulation of Metalloproteinase Expression in Chondrocytes by Wnt-1-Inducible Signaling Pathway Protein 3/CCN6; *Arthritis & Rheumatism*, 2012 Jul; 64 (7): 2289-2299
7. Ball D.K., Brigstock D.R.: Establishment of a recombinant CTGF expression system in vitro that models CTGF processing in vivo:

-
- structural and functional characterization of multiple mass CTGF proteins; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Feb; 54 (2): 109-120
8. Bartha L., Vajda A., Duska Z., Rahmeh H., Hangody L.: Autologous osteochondral mosaicplasty grafting; *J Orthop Sports Phys Ther*, 2006 Oct; 36 (10): 739-750
 9. Basilisco F.C., Sweeney G., Losina E., Gaydos J., Skoniecki D., Wright E.A., Katz J.N.: Risk factors for cardiovascular complications following total joint replacement surgery; *Arthritis Rheum*, 2008 Jul; 58 (7): 1915-1920
 10. Baumhoer, Steinbrück, Götz: *Histologie*; Urban & Fischer, 2000; 61-63
 11. Bayne C.O., Bayne O., Peterson M., Cain E.: Acute arterial thrombosis after bilateral total knee arthroplasty; *J Arthroplasty*, 2008 Dec; 23 (8): 1239.e1–1239.e6
 12. Bennani L., Amine B., Ichchou L., Lazrak N., Hajjaj-Hassouni N.: Progressive rheumatoid dysplasia: Three cases in one family; *Joint Bone Spine*; 2007 Jul; 74 (4): 393-395
 13. Benninghoff, Drenckhahn: *Anatomie, Band 1*; Urban & Fischer, 2003: 128-133
 14. Benninghoff, Drenckhahn: *Anatomie, Band 1*; Urban & Fischer, 2003: 254-266
 15. Bernardo M.E., Emons J.A., Karperien M., Nauta A.J., Willemze R., Roelofs H., Romeo S., Marchini A., Rappold G.A., Vukicevic S., Locatelli F., Fibbe W.E.: Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources; *Connect Tissue Res*, 2007; 48 (3): 132-140
 16. Boileau C., Tat S.K., Pelletier J.P., Cheng S., Martel-Pelletier J.: Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against

-
- subchondral bone remodeling; *Arthritis Res Ther*, 2008 Jun; 10 (3): R71
17. Boopalan P.R., Daniel A.J., Chittaranjan S.B.: Managing skin necrosis and prosthesis subluxation after total knee arthroplasty; *J Arthroplasty*, 2009 Feb; 24 (2): 322.e23-322.e27
 18. Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G., Takagi S., Okumura M., Fujinaga T.: Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis; *Biotechnology and Biochemistry*, 2006 Apr; 93 (6): 1152-1163
 19. Braun S., Imhoff A.B.: Autologous bone-cartilage transplantation. Biological and technical principles of OATS; *Arthroskopie*, 2005 Aug; 18 (3): 291-225
 20. Brigstock D.R.: CTGF in uterine function; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
 21. Brigstock D.R.: The CCN family: a new stimulus package; *Journal of Endocrinology*, 2003 Aug; 178 (2): 169-175
 22. Brown G.D., Swanson E.A., Nercessian O.A.: Neurologic injuries after total hip arthroplasty; *Am J Orthop*, 2008 Apr; 37 (4): 191-197
 23. Cadot B., Maillard M., Ball R.Y., Sethia K., Edwards D., Perbal B., Tatoud R.: Differential expression of NOVH proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
 24. Cefle A., Cefle K., Tunaci M., Ozturk S., Palanduz S.: A case of progressive pseudorheumatoid arthropathy of "childhood" with the diagnosis delayed to the fifth decade; *International Journal of Clinical Practice*, 2006 Oct; 60 (10): 1306-1309
 25. Chaqour B., Rosenbloom J., Macarek E.: Mechanical force-induced CYR61 gene expression in smooth muscle cells; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 113

-
26. Cheon H., Boyle D.L., Firestein G.S.: Wnt1 inducible signalling pathway protein-3 regulation and microsatellite structure in arthritis; *J Rheumatol*, 2004 Nov; 31 (11): 2106-2114
 27. Cherel Y., Schaum S., Leroux I., Guigand L., Perbal B., Wyers M.: NOV is expressed during in vitro differentiation of chicken muscular satellite cells; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
 28. Davies S.R., Watkins G., Manel R.E., Jiang W.G.: Differential Expression and Prognostic Implications of the CCN Family Members WISP-1, WISP-2, and WISP-3 in Human Breast Cancer; *Annals of Surgical Oncology*, 2007 Jun; 14 (6): 1909-1918
 29. Davis L., Chen Y., Sen M.: WISP-3 functions as a ligand and promotes superoxide dismutase activity; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006 Mar; 342 (1): 259-265
 30. Delorme B., Charbord P.: Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells; *Methods Mol Med*, 2007; 140: 67-81
 31. Desnoyers L., Pennica D.: Identification of WISP-1 binding factors; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
 32. Diaz-Romero J., Gaillard J.P., Grogan S.P., Nestic D., Trub T., Mainil-Varlet P.: Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: Changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture; *Journal of Cellular Physiology*, 2005 Mar; 202 (3): 731-742
 33. Ehl S., Uhl M., Berner R., Bonafé L., Superti-Furga A., Kirchhoff A.: Clinical, radiographic, and genetic diagnosis of progressive pseudorheumatoid dysplasia in a patient with severe polyarthropathy; *Rheumatology International*, 2004 Jan; 24 (1): 53-56; published online: <https://doi.org/10.1007/s00296-003-0341-0>
 34. El-Shanti H.E., Omari H.Z., Qubain H.I.: Progressive pseudorheumatoid dysplasia: report of a family and review; *Journal of Medical Genetics*, 1997 Jul; 34(7): 559-563

-
35. Fillmore C.M., Bartoli L., Bach R., Park Y.: Nutrition and dietary supplements; *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 1999 Aug; 10 (3): 673-703
 36. Fischer J., Urtizbera J.A., Pavsek S., Vandiedonck C., Bruls T., Saker S., Alkatip Y., Prud'homme J.-F., Weissenbach J.: Genetic linkage of progressive pseudorheumatoid dysplasia to a 3-cM interval of chromosome 6q22; *Human Genetics*, 1998 Jul; 103 (1): 60-64
 37. Francioli S.E., Candrian C., Martin K., Heberer M., Martin I., Barbero A.: Effect of three-dimensional expansion and cell seeding density on the cartilage-forming capacity of human articular chondrocytes in type II collagen sponges; *J Biomed Mater Res A*, 2010 Dec; 95 (3): 924-931
 38. Glukhova L., Angevin E., Lavialle C., Cadot B., Terrier-Lacombe M.-J., Perbal B., Bernheim A.: Tumorigenicity of high grade renal cell carcinomas and NOV expression; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
 39. Goessler U.R., Bieback K., Bugert P., Heller T., Sadick H., Hörmann K., Riedel F.: In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture; *Int J Mol Med*, 2006 Feb; 17 (2): 301-307
 40. Goldring M.B., Goldring S.R.: Osteoarthritis; *J Cell Physiol*, 2007 Dec; 213 (3): 626-634
 41. Goldring M.B.: Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases; *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006 Oct; 20 (5): 1003-1025
 42. Gregory P.J., Sperry M., Wilson A.F.: Dietary supplements for osteoarthritis; *Am Fam Physician*, 2008 Jan; 77 (2): 177-184
 43. Grotendorst G.R., Duncan M., Williams S., Klapper H.: Structure and functional analysis of CTGF; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120

-
44. Grzeszkiewicz T.M., Chen C.-C., Chen N., Lau L. F.: Integrins mediate CYR61-induced activities in human skin fibroblasts; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 114
 45. Hayashi N., Kakinuma T., Grotendorst G.R., Igarashi A.: The expression of connective tissue growth factor during wound healing; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
 46. Herold G.: *Innere Medizin, Köln*, 2006: 593-594
 47. Hurvitz J.R., Suwairi W.M., Van Hul W., El-Shanti H., Superti-Furga A., Roudier J., Holderbaum D., Pauli R.M., Herd K., Van Hul E., Rezai-Delui H., Legius E., Le Merrer M., Al-Alami J., Bahabri S.A., Warman M.L.: Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia; *Nature Genetics*, 1999 Sep; 23(1): 94-98
 48. Iwata K., Asawa Y., Fujihara Y., Tanaka Y., Nishizawa S., Nakagawa T., Nagata S., Takato T., Hoshi K.: The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultures chondrocytes; *Curr Aging Sci*, 2010 Feb; 3 (1): 26-33
 49. Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V.: Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications; *J Postgrad Med*, 2007 Apr-Jun; 53 (2): 121-127
 50. Kang S.W., Yoo S.P., Kim B.S.: Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage; *Biomed Mater Eng*, 2007; 17 (5): 269-276
 51. Karow T., Lang-Roth R.: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*, 2006
 52. Kaya A., Ozgocmen S., Kiris A., Ciftci I.: Clinical and radiological diagnosis of progressive pseudorheumatoid dysplasia in two sisters with severe polyarthropathy; *Clinical Rheumatology*, 2005 Oct; 24 (5): 560-564
 53. Kemp K.C., Hows J., Donaldson C.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *Leuk Lymphoma*, 2005 Nov; 46(11): 1531-1544

-
54. Kleer C.G., Ding L.: WISP3 (WNT-1 inducible signaling pathway protein 3); Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, Mar 2005
 55. Krämer, Grifka: Orthopädie Unfallchirurgie; Springer, 2007: 127-128
 56. Krasnokutsky S., Samuels J., Abramson S.B.: Osteoarthritis in 2007; Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases, 2007; 65 (3): 222-228
 57. Kuemmerle-Deschner J.B., Tcharibachev N., Holzhüter B., Drews K., Dannecker G.E.: Progressive pseudorheumatoid dysplasia: A rare disease in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis; Akt Rheumatol, 2003 Nov; 28(5)
 58. Kumar S., Connor J., James I., Votta B., Trill J., Yue K., Johanson K., Badger A., Gowen M., Lee J.: Identification and characterization of CTGF-L as a novel modulator of osteoblast and chondrocyte functions; J Clin Pathol: Mol Pathol, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
 59. Kutz W.E., Gong Y., Hurvitz J., Marcelino J., Warman M.L.: WISP-3 expression in eukaryotic cells; J Clin Pathol: Mol Pathol, 2001 Apr; 54(2): 109-120
 60. Kutz W.E., Gong Y., Warman M.L.: WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease Progressive Pseudorheumatoid Dysplasia, is not essential for skeletal function in mice; Mol Cell Biol, 2005 Jan; 25 (1): 414-421
 61. Leask A., Shiwen X., Sa S., Xu Y., Martin G.R., Holmes A.M., Black C.M., Abraham D.J.: Control of fibroblast extracellular matrix production by CTGF: Regulation by TGF- β , TNF- α and IL-1; J Clin Pathol: Mol Pathol, 2001 Apr; 54(2): 109-120
 62. Lee J., Lee E., Kim H.Y., Son Y.: Comparison of articular cartilage with costal cartilage in initial cell yield, degree of dedifferentiation during expansion and redifferentiation capacity; Biotechnol Appl Biochem, 2007 Nov; 48 (3): 149-158

-
63. Lefebvre V., Peeters-Joris C., Vaes G.: Production of collagenase and collagenase inhibitor during the dedifferentiation of articular chondrocytes by serial subcultures; *Biochim Biophys Acta*, 1990 Mar; 1051 (3): 266-275
 64. Legius E., Mulier M., Van Damme B., Fryns J.P.: Progressive pseudorheumatoid arthritis of childhood (PPAC) and normal adult height; *Clin Genet*, 1993 Sep; 44(3): 152-155
 65. Lehmann L., Stöve J.: Aktuelle Aspekte zur Ätiologie und Therapie des Arthroseschmerzes; *Der Schmerz*, 2004 Nov; 18(6): 453-462
 66. Little C.V., Parsons T.: Herbal Therapy for treating osteoarthritis; *Cochrane Database Syst Rev*, 2001; (1): CD002947
 67. Lories J.: Joint homeostasis, restoration, and remodelling in osteoarthritis; *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 2008 Apr; 22 (2): 209-220
 68. Mampaey S., Vanhoenacker F., Boven K., Van Hul W., De Schepper A.: Progressive pseudorheumatoid dysplasia; *Eur Radiol*, 2000 Feb; 10 (11): 1832-1835
 69. Martel-Pelletier J., Boileau C., Pelletier J.P., Roughley P.J.: Cartilage in normal and osteoarthritis conditions; *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 2008 Apr; 22 (2): 351-384
 70. Moe R.H., Haavardsholm E.A., Christie A., Jamtvedt G., Dahm K.T., Hagen K.B.: Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for hip osteoarthritis: an umbrella review of high-quality systematic reviews; *Phys Ther*, 2007 Dec; 87 (12): 1716-1727
 71. Moriya T., Wada Y., Watanabe A., Sasho T., Nakagawa K., Mainil-Varlet P., Moriya H.: Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte transplantation for osteochondrosis dissecans: histology, biochemistry, and MR imaging; *J Orthop Sci*, 2007 May; 12 (3): 265-273
 72. Moussad E., Rageh M., Tassava R., Brigstock D.R.: Localization of connective tissue growth factor in normal regenerating and

-
- denervated non-regenerating scarring limb stumps of adult newts; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
73. Nakamura Y., Weidinger G., Liang J.O., Aquilina-Beck A., Tamai K., Moon R.T., Warman M.L.: The CCN family member WISP3, mutant in progressive pseudorheumatoid dysplasia, modulates BMP and Wnt signalling; *Clin Invest* 117, 2007 Oct; 117 (10): 3075-3086
74. Needham J., Burns T., Gerlinger T.: Catastrophic failure of ceramic-polyethylene bearing total hip arthroplasty; *J Arthroplasty*, 2008 Jun; 23 (4): 627-630
75. Niethard, F.U., J. Pfeill: *Duale Reihe Orthopädie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2005: 184-190
76. Oreffo R.O., Cooper C., Mason C., Clements M.: Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential; *Stem Cell Rev*, 2005 Jun; 1(2): 169-178
77. Paradis V., Dargère D., Ba N., De Gouville A.-C., Huet S., Gauthier J.-M., Bedossa P.: Connective tissue growth factor (CTGF) expression in experimental and human liver fibrogenesis; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
78. Perbal B.: The CCN proteins: multipotent matchmakers?; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 112
79. Pittler M.H., Brown E.M., Ernst E.: Static magnets for reducing pain: systematic review and meta-analysis of randomized trials; *CMAJ*, 2007 Sep; 177 (7): 736-742
80. Porat M.D., Austin M.S.: Bilateral knee periprosthetic infection with *Mycobacterium fortuitum*; *J Arthroplasty*, 2008 Aug; 23 (5): 787-789
81. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J.: *Basislehrbuch Innere Medizin*; Elsevier, 2004: 1051-1053
82. Riser B.L., Cortes P., Grondin J., Deshmukh P.V., Chahal P.S.: Urinary CTGF: A potential predictor of diabetic nephropathy; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 109-120
83. Sandoval E., Ortega F.J., García-Rayó M.R., Resines C.: Popliteal pseudoaneurysm after total knee arthroplasty secondary to

-
- intraoperative arterial injury with a surgical pin review of the literature; *J Arthroplasty*, 2008 Dec; 23 (8): 1239.e7-1239.e11
84. Scharstuhl A., Schewe B., Benz K., Gaissmaier C., Bühring H.J., Stoop R.: Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology; *Stem Cells*, 2007 Dec; 25 (12): 3244-3251
85. Schiebler T.H., Korf H.W.: *Anatomie*; Steinkopff, 2007: 46-49
86. Schnabel M., Marlovits S., Eckhoff G., Fichtel I., Gotzen L., Vécsei V., Schlegel J.: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture; *Osteoarthritis Cartilage*, 2002 Jan; 10 (1): 62-70
87. Schober J.M., Lau L. F., Lam S. C.-T.: Integrin α M β 2 acts as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes and THP-1 cells for CYR61 and Connective Tissue Growth Factor; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 115
88. Schütze N., Lechner A., Müller J., Eulert J., Jakob F.: Expression and regulation of hCYR61 in human bone cells; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54 (2): 114
89. Schütze N., Noth U., Schneiderei J., Hendrich C., Jakob F.: Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation; *Cell Communication and Signaling* 2005 Mar; 3 (1): 5
90. Sen M., Cheng Y.-H., Goldring M.B., Lotz M.K., Carson D.A.: WISP3-dependent regulation of type II collagen and aggrecan production in chondrocytes; *Arthritis and Rheumatism*, 2004 Feb; 50 (2): 488-497
91. Shivanand G., Jain V., Lal H.: Progressive pseudorheumatoid chondrodysplasia of childhood; *Singapore Med J*, 2007 May; 48(5): 151-153
92. Spranger J., Albert C., Schilling F., Bartsocas C., Stöss H.: Progressive pseudorheumatoid arthritis of childhood (PPAC). A

-
- hereditary disorder simulating rheumatoid arthritis; *Eur J Pediatr*, 1983 Mar; 140 (1): 34-40
93. Tahri D., Andermarcher E., Schofield P., Boulter C.: NOV promotes proliferation and early myogenic differentiation of 10T1/2 fibroblasts; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
94. Tallheden T., Brittberg M., Peterson L., Lindahl A.: Human articular chondrocytes - plasticity and differentiation potential; *Cells Tissues Organs*, 2006; 184 (2): 55-67
95. Taylor D.W., Ahmed N., Gan L., Gross A.E., Kandel R.A.: Proteoglycan and collagen accumulation by passaged chondrocytes can be enhanced through side-by-side culture with primary chondrocytes; *Tissue Eng Part A*, 2010 Feb; 16 (2): 643-651
96. Thirion S., Berenbaum F.: Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture; *Methods Mol Med*, 2004; 100: 1-14
97. Thorstensen L., Diep C.B., Meling G.I., Aagesen T.H., Ahrens C.H., Rognum T.O., Lothe R.A.: WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability; *Gastroenterology*, 2001 Dec; 121 (6): 1275-1280
98. Tsai M.-S., Lupu R.: Involvement of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer tumor progression; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 116
99. Vilguin J.T., Rosset P.: Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status; *Regen Med*, 2006 Jul, 1 (4): 589-604
100. Vukicević S., Jelić M., Haspl M.: Cultivation and implantation of chondrocytes; *Acta Med Croatica*, 2007 Dec; 61 (5): 453-457
101. Weber C., Gokorsch S., Czermak P.: Expansion and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells; *Int J Artif Organs*, 2007 Jul; 30 (7): 611-618
102. Wenger C., Gress T. M.: CCN-family members in pancreatic diseases; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 119-120

-
103. White A., Foster N.E., Cummings M., Barlas P.: Acupuncture treatment for chronic knee pain: a systematic review; *Rheumatology (Oxford)*, 2007 Mar; 46 (3): 384-390
 104. Wieland H.A., Michaelis M., Kirschbaum B.J., Rudolphi K.A.: Osteoarthritis – an untreatable disease?; *Nat Rev Drug Discov*, 2005 Apr; 4 (4): 331-344
 105. Wilson A.K., Clark K.R., Brigstock D.R.: Novel models of CTGF transgenesis in vivo: Recombinant adeno-associated viral (RAAV) mediated delivery of the CTGF gene; *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001 Apr; 54(2): 109-120
 106. Wong C.C., Chiu L.H., Lai W.F., Tsai T.T., Fang C.L., Chen S.C., Tsai Y.H.: Phenotypic re-expression of near quiescent chondrocytes: The effects of type II collagen and growth factors; *J Biomater Appl*, 2010 Jul; 25 (1): 75-95
 107. Wülker N., Kluba T., Rehart S., Reize P., Roetman B., Rudert M.: Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie; 2005: 19-21
 108. Yang J.J., Chen Y.M., Liu J.F., Kurokawa T., Gong J.P.: Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces; *Tissue Eng Part A*, 2010 Aug; 16 (8): 2529-2540
 109. Yang Y., Liao E.: Mutant WISP3 triggers the phenotype shift of articular chondrocytes by promoting sensitivity to IGF-1 hypothesis of spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy (SED-T-PA); *Medical Hypotheses*, 2007; 68 (6): 1407-1410
 110. Yeger H., Perbal B.: The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential; *J Cell Commun Signal*, 2007 Dec; 1 (3): 159-164
 111. Yu H., Yeger H., Perbal B., Alman B.: NOV expression and regulation in the growth plate and in cartilage tumours; *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001 Apr; 54(2): 109-120
 112. Zhang Y., Chai G., Liu W., Zhou G.D., Cui L., Cao Y.L.: Microarray analysis of dedifferentiation related gene expression of human

chondrocytes cultured in vitro; Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi,
2007 Jul, 23 (4): 331-334

7 Abbildungen

Abb. 1	Hyaliner Knorpel, Anordnung der Knorpelzellen und Verlauf der Collagenfasern	9
Abb. 2	Interzellulärsubstanz	10
Abb. 3	Hyaliner Knorpel - Rippenknorpel	12
Abb. 4	Funktioneller Bau und Zonierung des hyalinen Gelenkknorpels	13
Abb. 5	Elastischer Knorpel	14
Abb. 6	Faserknorpel	14
Abb. 7	Klinische, radiografische und szintigrafische Bilder der rechten Hand	17
Abb. 8	Die modulare Struktur der CCN-Familie	19
Abb. 9	Ch.Pat.1 3W +TGF+WISP, Färbung: Alcian	45
Abb. 10	Ch.Pat.1 3W Kontrolle, Färbung: Alcian	46
Abb. 11	KN 350 3W +WISP, Färbung: Alcian	47
Abb. 12	KN 350 3W Kontrolle, Färbung: Alcian	48
Abb. 13	Ch.Pat.1 3W +TGF, Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung	49
Abb. 14	KN350 1,5W +WISP, Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung	50
Abb. 15	KN350 1,5W Kontrolle Färbung: Collagen Typ II-Antikörper-Färbung	51
Abb. 16	KN350 3W +TGF+WISP, Färbung: Apoptose-Färbung Annexin V-CY3	52
Abb. 17	Ch.Pat.1 PCR auf Aggrecan	53
Abb. 18	Auswertung Ch.Pat.1 PCR auf Aggrecan	53
Abb. 19	Ch.Pat.2 PCR auf Aggrecan	54
Abb. 20	Auswertung Ch.Pat.2 PCR auf Aggrecan	54
Abb. 21	Ch.Pat.1 PCR auf Collagen II	55
Abb. 22	Auswertung Ch.Pat.1 PCR auf Collagen II	55
Abb. 23	Ch.Pat.2 PCR auf Collagen II	56
Abb. 24	Auswertung Ch.Pat.2 PCR auf Collagen II	57
Abb. 25	MSC 322 PCR auf Aggrecan	58
Abb. 26	Auswertung MSC 322 auf Aggrecan	58

Curriculum Vitae

Heike Ruoff

Heusteigstr. 84b
70180 Stuttgart
Tel.: 0711-91299015
Handy: 0172-7413001
Email: Heike.Ruoff@gmail.com

Geboren am 30.07.1982 in Stuttgart-Bad Cannstatt
Verheiratet

Schulbildung

1989 – 1992	Grundschule in Simmozheim
1992 – 1993	Mörikeschule in Leonberg
1993 – 2002	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg

Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,3)

Freiwilliges Soziales Jahr

09/2002 - 03/2003	Universitätsklinikum Tübingen
-------------------	-------------------------------

Chirurgie (Schwerpunkt Viszeralchirurgie)

Hochschulstudium

04/2003 - 06/2009	Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-Universität Würzburg
2005	Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)

Approbation als Ärztin

Famulaturen

09/2005 - 10/2005	Praxis Dr. Nafz (Osterburken)
-------------------	-------------------------------

Allgemeinmedizin/Pädiatrie/Betriebsmedizin

02/2006 - 03/2006	Juliusspital Würzburg
-------------------	-----------------------

08/2006 - 09/2006 *Innere Medizin (Schwerpunkt Gastroenterologie /
Rheumatologie)*
Universitätsklinikum Würzburg
Anästhesiologie

03/2007 Severance Hospital Seoul (Südkorea)
Radiologie (Schwerpunkt Gastroenterologie)

09/2007 Gartnavel General Hospital Glasgow (Schottland)
Urologie

Praktisches Jahr

02/2008 - 06/2008 Universitätsklinikum Würzburg
*Innere Medizin (Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie
und Pulmologie)*

06/2008 - 10/2008 Universitätsklinikum Würzburg
Gynäkologie und Geburtshilfe

10/2008 - 01/2009 Spitalzentrum Biel/Centre hospitalier Bienne (Schweiz)
Chirurgie

Beruflicher Werdegang

09/2009 – 03/2015 Assistenzärztin in der Medius Klinik Ostfildern-Ruit

03/2015 Facharztprüfung Gynäkologie und Geburtshilfe

Seit 04/2015 Fachärztin in der Medius Klinik Ostfildern-Ruit
Gynäkologie und Geburtshilfe

Fortbildungen

- Kreißsaal-Führerschein und Refresher Kreißsaal-Führerschein
 - Psychosomatische Grundversorgung
 - Dopplersonographie in Gynäkologie und Geburtshilfe (Grund-, Aufbau und Abschlusskurs)
 - Grundkurs Mammasonographie
 - Grundkurs Urogynäkologie
 - Prüfarzt für AMG-Studien
-

-
- Qualifikation zur fachgebundenen genetischen Beratung für Gynäkologie
 - Grundkurs für Hygienebeauftragte Ärzte
 - Qualifikation Transfusionsbeauftragter/Transfusionsverantwortlicher

Heike Ruoff
