

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert

**Einfluss von CYR61 auf die chondrogene Differenzierung humaner Chondrozyten**

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

vorgelegt von

**Volkan Göktas**

aus Röhlein

Würzburg, Oktober 2009

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2010

Der Promovend ist Arzt

**Meinen Eltern**

<b>1. Einleitung</b>		
1.1	Aufbau von Knorpelgewebe	1
1.2	Funktion von Knorpelgewebe	1
1.3	Differenzierung von Chondrozyten	3
1.3.1	Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung	4
1.3.2	Signalmoleküle in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung	5
1.4	Charakterisierung von CYR61	6
1.4.1	Die Familie der CCN Proteine	6
1.4.2	Regulation von CYR61	7
1.4.3	Funktionen von CYR61	8
1.4.4	Integrinrezeptoren	9
1.5	Ziel der Arbeit	10
<b>2. Material und Methoden</b>		
2.1	Materialien	11
2.2	Methoden	11
2.2.1	Zellkultur	11
2.2.1.1	Kultivierung der Zellen	11
2.2.1.2	Behandlung der Zellen	12
2.2.1.3	Isolierung der Zellen	13
2.2.2	Isolierung der RNA	13
2.2.3	cDNA-Synthese	14

2.2.4	Reverse- Transkriptase- Polymerasekettenreaktion	14
2.2.5	Agarose Gelelektrophorese	15
2.2.6	Densitometrie	16
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Einleitung	17
3.2	Primerliste und PCR-Bedingungen	17
3.3	Darstellung der Gelelektrophorese und der densitometrischen Auswertung	19
3.3.1	Kollagen I	21
	3.3.1.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	21
3.3.2	Kollagen II	24
	3.3.2.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	24
3.3.3	Kollagen III	27
	3.3.3.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	27
	3.3.3.2 Versuche für die T/C-28a2-Zellen	30
3.3.4	Kollagen XI	33
	3.3.4.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	33
3.3.5	Aggrecan	36
	3.3.5.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	36
3.3.6	Biglykan	39
	3.3.6.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen	39
3.3.7	Chondroadhaerin	41

3.3.7.1	Versuche für die C-28/I2-Zellen	42
3.3.7.2	Versuche für die T/C-28a2-Zellen	45
3.3.8	Decorin	48
3.3.8.1	Versuche für die C-28/I2-Zellen	48
3.3.9	Fibromodulin	51
3.3.9.1	Versuche für die C-28/I2-Zellen	51
3.3.9.2	Versuche für die T/C-28a2-Zellen	54
3.3.10	Versican	57
3.3.10.1	Versuche für die C-28/I2-Zellen	57
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Ziel der Arbeit	60
4.2	Funktionsfähigkeit des rekombinaten Proteins	60
4.3	Endogenes CYR61	61
4.4	Chondrogene Differenzierung in unterschiedlichen Zellkulturen	61
4.5	Reverse- Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion	62
4.6	Bewertung der Ergebnisse	62
4.6.1	Vergleich der Ergebnisse zwischen serumreduzierten und serumhaltigen Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen	62
4.6.1.1	Kollagene Typ I, II, III und XI	62
4.6.1.2	Proteoglykane	64

4.6.2	Vergleich der Ergebnisse zwischen den C-28/I2-Zellen und T/C-28a2-Zellen	66
4.6.3	CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung	67
4.6.3.1	CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung der C-28/I2-Zellen	68
4.6.3.2	CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung der T/C-28a2-Zellen und Vergleich der Ergebnisse mit den C-28/I2-Zellen	71
4.7	Ausblick	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>83</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

## **1 Einleitung**

### **1.1 Aufbau von Knorpelgewebe**

Knorpel gehört ebenso wie Knochen, Sehnen und Bänder zu den geformten Bindegeweben. Reifer Knorpel besteht aus Knorpelzellen, den Chondrozyten und extrazellulärer Matrix (EZM). Eng anliegend an die Zellmembran der Knorpelzelle befindet sich die perizelluläre Matrix, welche von der Territorial- Region umgeben ist. Die Einheit aus Knorpelzelle, perizellulärer Matrix und Territorial- Region bezeichnet man als Chondron. Für die Bildung und Erhaltung der EZM ist diese Einheit verantwortlich. Die Bereiche zwischen den Chondronen nennt man interterritoriale Matrix.

Knorpel ist weder durchblutet, noch innerviert. Für die Ernährung spielen Diffusionsprozesse aus umgebenden Kapillaren und der Synovialflüssigkeit eine Rolle. Unterschiedliche Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle, Matrixproteine und auch mechanische Einflüsse regulieren den Knorpelstoffwechsel und die Zusammensetzung der EZM. Ein Ungleichgewicht im Zusammenspiel dieser Größen kann Erkrankungen des Knorpels wie rheumatoide Arthritis oder auch Achondroplasie zur Folge haben.

Der Anteil der Chondrozyten am Gesamtvolumen des Knorpels beträgt in etwa 10 %. Den weitaus größten Anteil nimmt die EZM ein. Die Hauptkomponenten der EZM sind Wasser, mit einem Anteil von 65 – 80 % am Feuchtgewicht im Gelenkknorpel, und Makromoleküle in unterschiedlicher Zusammensetzung je nach Differenzierungsgrad und Lokalisation der Chondrozyten. Die wesentlichen Makromoleküle lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, die Kollagene und die Proteoglykane. Hauptvertreter dieser beiden großen Gruppen sind Typ II Kollagen und Aggrecan. Daneben gibt es eine Reihe anderer Bestandteile wie Strukturglykoproteine, Lipide oder auch Phospholipide die nur einen geringen Anteil am Gesamtvolumen des Knorpels einnehmen (Poole, 1997).

### **1.2 Funktion von Knorpelgewebe**

Chondrozyten leiten sich von Zellen ab, die ihren Ursprung im embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) haben. Sie beteiligen sich an der Entwicklung von Knochen (Osteogenese), Gelenken und am Längenwachstum von Knochen (Karsenty und Wagner, 2002).

Man unterscheidet zwei Arten der Knochenbildung. Einerseits die direkte Knochenbildung, intramembranöse Ossifikation, bei der mesenchymale Zellen sich zu Knochenzellen



(Osteoblasten) differenzieren und die Knochengrundsubstanz produzieren. Auf diese Weise entsteht ein Teil der Schädelknochen. Andererseits spricht man von indirekter Knochenbildung, enchondraler Ossifikation, wenn zunächst ein Knorpelmodell gebildet wird, das anschließend abgebaut und durch Knochen ersetzt wird. So entwickelt sich ein Großteil des Skeletts. Hier steht zu Beginn der Entwicklung die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten.

Primär läuft die enchondrale Ossifikation langer Röhrenknochen an der Diaphyse ab. Erst zu einem späteren Zeitpunkt kommt es zur Verknöcherung der Epiphyse. Im jugendlichen Alter sind sowohl Diaphyse, als auch Epiphyse weitestgehend verknöchert. Lediglich eine Umbauzone, die sogenannte Wachstumsfuge, zwischen Diaphyse und Epiphyse bleibt noch unverknöchert. In diesem Bereich befinden sich Chondrozyten unterschiedlicher Differenzierungsstufen, die für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich sind (Ortega et al., 2004).

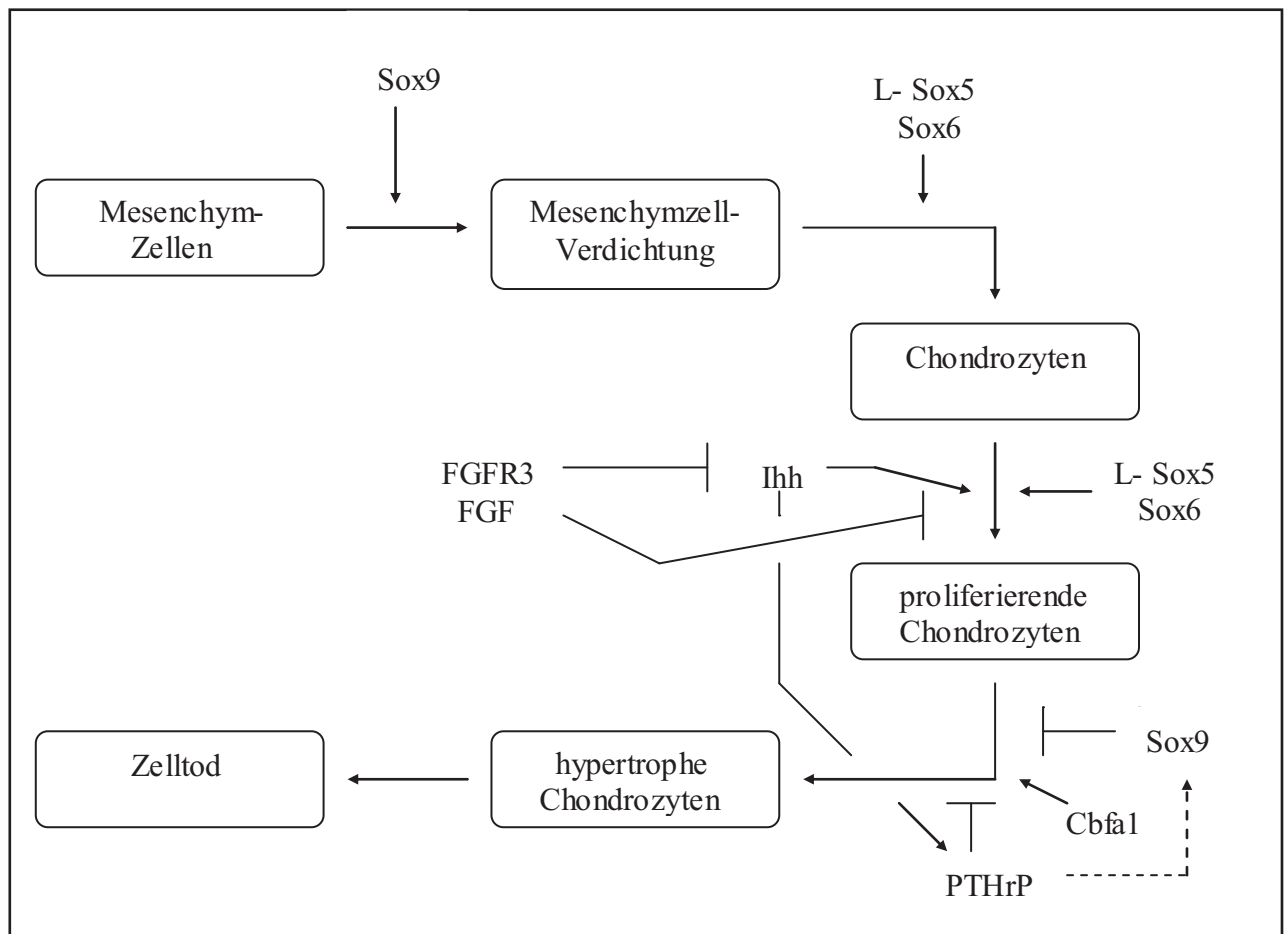
Sobald sich mesenchymale Zellen zu Chondrozyten differenziert haben, beginnen sie mit der Synthese spezifischer Markermoleküle, wie Aggrecan und Typ II Kollagen. Das umgebende Bindegewebe, das Perichondrium, enthält noch undifferenzierte mesenchymale Zellen. Nachdem sich die Knorpelmatrix ausgebildet hat, differenzieren sich die Chondrozyten weiter zu hypertrophen Chondrozyten. Diese sind durch ihr verändertes Expressionsmuster von spezifischen Markergenen charakterisiert. Zusätzlich zur Synthese von Typ II Kollagen bilden die hypertrophierten Zellen Typ X Kollagen. Etwa zum Zeitpunkt der Differenzierung zum hypertrophen Chondrozyten entwickeln sich aus noch undifferenzierten Zellen des Perichondriums Osteoblasten. Diese bilden eine mineralisierte Knochenmanschette um den Knorpelkern. Ausgehend von dieser Manschette erfolgt der Abbau der Knorpelvorlage und der Ersatz durch Knochengewebe. An den Enden des zukünftigen Knochens bleibt jedoch eine Umbauzone von der Ossifikation zunächst ausgespart. Hier sind die Chondrozyten ihrem Differenzierungszustand entsprechend in Säulen angeordnet. Diese Säulen sind gegliedert in eine Reservezone, eine Proliferationszone, eine prehypertrophe und hypertrophe Zone. Diese Unterteilung repräsentiert die unterschiedlichen Entwicklungsstufen während des Längenwachstums von Knochen. Erst mit Abschluss der Pubertät verknöchert auch die Wachstumsfuge.

Neben Knochenentwicklung und Längenwachstum sind Chondrozyten auch an der Bildung der Gelenke beteiligt. Der Bereich in dem das Gelenk entstehen soll, ist durch eine erhöhte Zelldichte gekennzeichnet, wobei sich drei Zonen unterscheiden lassen. Aus den beiden äußeren Zonen entwickelt sich jeweils der Gelenkknorpel. Die Zellen in der mittleren Schicht

gehen durch Apoptose (programmierter Zelltod) zugrunde und bilden auf diese Weise die spätere Gelenkhöhle (Karsenty, Wagner, 2002).

### 1.3 Differenzierung von Chondrozyten

Abb. 1) Regulation der Chondrozytendifferenzierung ( modifiziert nach de Crombrugge et al., 2001)



Legende zu Abb. 1) Transkriptionsfaktoren (L- Sox5, Sox6, Sox9, Cbfa1) und Signalmoleküle (FGF, FGFR3, Ihh, PTHrP) regulieren Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten. Sie haben entweder aktivierende (→) oder hemmende (T) Wirkung. Die gestrichelte Linie beruht auf Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten. Alle anderen Effekte stellen die Verhältnisse *in vivo* dar.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FGF: Fibroblast growth factor, FGFR3: Fibroblast growth factor receptor 3, Ihh: Indian hedgehog, PTHrP: Parathyroid hormone related peptide

### 1.3.1 Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung

Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren regulieren den Differenzierungsprozess der Chondrozyten und damit die Knorpelentwicklung (Chondrogenese) (siehe Abb. 1). Anhand einer Reihe von Untersuchungen konnte die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sox9, aus der Familie der HMG-Box Klasse der DNA bindenden Proteine, für die Knorpelentstehung gezeigt werden (Bi et al., 1999; Ng et al., 1997; Wagner et al., 1994). Mäuseembryonen exprimieren Sox9 in Chondrozytenvorläufern und Chondrozyten, nicht jedoch in hypertrophen Chondrozyten (Ng et al., 1997; Wright E., 1995). Mutationen im Sox9- Gen von Mäusen, die einen heterozygoten Defekt zur Folge haben, sind durch eine Längenzunahme der Zone hypertropher Chondrozyten und eine frühe Mineralisation der Knorpelmatrix charakterisiert (Bi et al., 2001). Eine normale Aktivität von Sox9 scheint jedoch notwendig zu sein, um eine ausreichende Inhibition der Differenzierung proliferierender Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten zu gewährleisten (de Crombrugge et al., 2001).

Eine weitere Wirkung des Transkriptionsfaktors Sox9 auf die Chondrogenese konnte anhand eines Experimentes mit Mauschimären gezeigt werden. Embryonale Stammzellen mit einem homozygoten Defekt für das Sox9- Gen wurden in Wildtyp- Blastozyten injiziert. Die Zellen mit dem homozygoten Defekt waren nicht in der Lage, Sox9 zu exprimieren. Die Folge war, dass alle Zellen mit dem Gendefekt, im Gegensatz zu den Wildtypzellen, nicht an den Mesenchymzellverdichtungen teilnehmen und auch keine chondrozytenspezifischen Marker wie Typ II oder XI Kollagen und Aggrecan exprimieren (Bi et al., 1999). Dieses Experiment zeigt, dass Sox9 die frühe Phase der Chondrogenese reguliert, für die das Zusammenrücken mesenchymaler Zellen Kennzeichen ist und die die Voraussetzung für die Differenzierung der Chondrozyten bildet (de Crombrugge et al., 2001).

L-Sox5 und Sox6 sind zwei weitere Mitglieder der Sox- Familie die im Rahmen der Knorpelentwicklung zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Sox9 exprimiert werden. Ebenso wie das Sox9-Gen werden auch L-Sox5 und Sox6 nicht durch hypertrophe Chondrozyten exprimiert. L-Sox5 und Sox6 zeichnen sich durch ein hohes Maß an Sequenzhomologie aus und gehören einer anderen Untergruppe der Sox Proteine an als Sox9. Mit Ausnahme für die HMG-Box haben auf der einen Seite L-Sox 5 und Sox6 und auf der anderen Seite Sox9 keine gemeinsame Sequenzhomologie. In DNA Transfektionsexperimenten sind L-Sox5 und Sox6 zusammen mit Sox9 in der Lage die Gene für Kollagen Typ II sowie Aggrecan zu aktivieren (de Crombrugge et al., 2001; Lefebvre et al., 1998).

Einen zusätzlichen Beleg für die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren L-Sox5 und Sox6 lieferten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Mäusen, denen sowohl das Genprodukt von L-Sox5 als auch von Sox6 fehlte. Dieser Funktionsverlust der Gene hatte ein Absterben des Fetus im Uterus zur Folge. Charakterisiert wird dieser Defekt durch die fehlende Differenzierung von Chondrozytenvorläufern bis hin zu den hypertrophen Zellformen. Der Differenzierungsverlust äußerte sich auch im Fehlen der säulenförmigen Anordnung der Zellen in der Wachstumsfuge. Diese Ergebnisse zeigen, dass L-Sox5 und Sox6 für die Weiterdifferenzierung der Zellen aus den Mesenchymzellverdichtungen nötig sind und eine wichtige Funktion im Rahmen der Expression von Matrixproteinen einnehmen (Smits et al., 2001).

Cbfa1 (= Runx 2) ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor der Runx-Familie der sowohl an der Knorpel-, als auch an der Knochenentwicklung beteiligt ist. Er fördert die Reifung proliferierender Chondrozyten zu hypertrophen Zellformen. Auf diese Weise wird die Grundlage zur Knochenbildung gelegt, da hypertrophe Chondrozyten rasch durch Apoptose zugrunde gehen und Osteoblasten einwandern können, die dann Knochenmatrix bilden (de Crombrughe et al., 2001).

### **1.3.2 Signalmoleküle in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung**

Neben den Transkriptionsfaktoren spielen auch einige Signalmoleküle in der Koordinierung des Differenzierungsprozesses eine entscheidende Rolle. Aktivierende Mutationen im Gen des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren 3 (FGFR3) führen zur Achondroplasie (ACH) oder zur thanatophoren Dysplasie (Rousseau et al., 1994; Tavormina et al., 1995). Folge dieser Mutationen ist eine Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)- unabhängige Aktivierung des Rezeptors. Mäuse mit diesem Defekt sind durch Kleinwüchsigkeit und eine Abnahme der Proliferationsrate von Chondrozyten gekennzeichnet (Iwata et al., 2000; Li et al., 1999). Im Gegensatz dazu zieht eine Inaktivierung des FGFR3 eine Zunahme des Längenwachstums nach sich. Diese Tatsache äußert sich auch in einer Ausweitung der Zone proliferierender Chondrozyten innerhalb der Wachstumsfuge. Diese Beobachtungen zeigen, dass FGFR3 und sein Ligand FGF, eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Chondrozyten haben (Deng et al., 1996).

Indian hedgehog (Ihh) ist ein weiterer wesentlicher Faktor, welcher den Differenzierungsprozess der Chondrozyten reguliert. Einerseits fördert Ihh die Proliferation von Chondrozyten direkt, andererseits wird die Expression von PTHrP durch Zellen des

Perichondriums gesteigert. Über diesen PTHrP vermittelten Weg wird die weitere Reifung proliferierender Chondrozyten zu den hypertrophen Zellformen gehemmt (St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996). Im Zuge der FGFR3 bedingten Signaltransduktion wird die Expression von Ihh gehemmt, so dass an dieser Stelle eine Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen vorliegt (Naski et al., 1998).

Insgesamt gesehen ist der Differenzierungsprozess der Chondrozyten sehr komplex und ein teilweise unverstandenes Netzwerk im Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren.

## **1.4 Charakterisierung von CYR61**

### **1.4.1 Die Familie der CCN Proteine**

Die Familie der CCN Proteine besteht zur Zeit aus sechs Mitgliedern; hierzu zählt man das Cystein-reiche Protein 61 (CYR61, CCN1), den Bindegewebs-Wachstumsfaktor (CTGF, CCN2), das Nephroblastoma-überexprimierte Protein (NOV, CCN3), das induzierbare Signalwegprotein-1 (WISP-1, CCN4), WISP-2 (CCN5) und WISP-3 (CCN6) (Grzeszkiewicz et al., 2002). Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie sezerniert werden und mit der EZM assoziiert sind. Sie regulieren unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Mitose und Differenzierung, sowie komplexe biologische Vorgänge wie Angiogenese, Chondrogenese, Wundheilung und Tumorstadium (Lau und Lam, 1999).

Eine weitere Besonderheit der CCN Proteine, ist deren charakteristischer Strukturaufbau. Sie bestehen aus einem N-Terminal gelegenen sekretorischem Signalpeptid, gefolgt von vier unterschiedlichen Domänen und insgesamt 38 Cystein- Resten. Jede Domäne weist Sequenzhomologien zu anderen bekannten Proteinen auf. Domäne I zu Insulin like growth factor binding protein (IGFBP), Domäne II zu von Willebrand factor type C repeat (VWC), Domäne III zu Thrombospondin type I repeat (TSP1) und Domäne IV, das C- terminale Ende, zeigt Ähnlichkeiten mit dem C- terminalen Ende anderer extrazellulärer Proteine. Eine Ausnahme bildet WISP-2, welches durch ein Fehlen der Domäne IV gekennzeichnet ist. Die genauen Funktionen der einzelnen, durch unterschiedliche Exons codierten Domänen sind noch nicht ausreichend geklärt. Man nimmt zum Beispiel an, dass die Domäne IV im Zusammenhang mit der Proteindimerisation steht (Lau et Lam, 1999).

### 1.4.2 Regulation von CYR61

Eine Vielzahl transkriptionsregulierender biologischer Faktoren führt zur raschen und vorübergehenden Aktivierung von Frühe- Phase- Genen, ohne die Notwendigkeit einer *de novo* Proteinbiosynthese (Lau und Nathans, 1991; Herschmann, 1991). Die Gruppe der CCN Proteine gehört zu diesen Frühe- Phase- Genen. Ein Vertreter dieser Familie, CYR61, wurde als ein durch Wachstumsfaktoren induzierbares Frühe- Phase- Gen in Mäuse- Fibroblasten identifiziert (O'Brien et al., 1990). Zusätzlich zur Geninduktion durch Serumwachstumsfaktoren wie dem Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (bFGF), dem Plättchen abstammendem Wachstumsfaktor (PDGF) oder dem transformierendem Wachstumsfaktor (TGF) in Fibroblasten wird CYR61 durch Vitamin D<sub>3</sub> in humanen fetalen Osteoblasten, durch Östrogen und Tamoxifen im Uterus ovariectomierter Ratten oder im Rahmen neuronaler Differenzierung immortalisierter hippocampaler Zelllinien induziert (Lau und Lam, 1999).

Das CYR61- Gen von Mäusen kodiert für ein Cystein- reiches Protein, bestehend aus 379 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41708 Da (O'Brien et al., 1990). Die humane Form von CYR61 weist noch zu 91% Homologien in der Aminosäuresequenz zum Genprodukt der Maus auf (Lau und Lam, 1999).

CYR61 ist ein sezerniertes (Lechner et al, 2000), eng mit der EZM und der Zelloberfläche assoziiertes und Heparin bindendes Protein. Die Assoziation mit der EZM ist nichtkovalent und wird über die Interaktion mit heparansulfathaltigen Proteoglykanen vermittelt. In die EZM eingebettetes CYR61 hat eine Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden, wohingegen das mit der Zelloberfläche assoziierte Protein rasch in die Zelle aufgenommen und abgebaut wird (Lau und Lam, 1999).

Möglicherweise ist der hohe Cystein- Gehalt verantwortlich für die schwierige Herstellung und Reinigung des aus der CCN Familie stammenden Proteins (Lau und Lam, 1999). Das Verständnis für die unterschiedlichen biologischen Funktionen von CYR61 wurde durch die Gewinnung von rekombinantem CYR61 ermöglicht. Hierzu wurden Sf9 Insektenzellen mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert und unter serumfreien Bedingungen CYR61 in gereinigter Form gewonnen (Kireeva et al., 1996; Schütze et al., 2005).

### 1.4.3 Funktionen von CYR61

Eine Vielzahl biologischer Funktionen ist für das CYR61 Protein bereits beschrieben worden. CYR61 steigert die durch Wachstumsfaktoren induzierte DNA Syntheserate von Fibroblasten und Endothelzellen. Das Protein weist jedoch kaum eigene Mitoseaktivität auf, wodurch es sich von den eigentlichen Wachstumsfaktoren unterscheidet (Kireeva et al., 1996). Als ein Molekül der EZM ist CYR61 auch durch seine adhäsiven Eigenschaften gekennzeichnet. Es fördert die Anhaftung von Fibroblasten und Endothelzellen an die EZM und ist an der gerichteten Zielbewegung (Chemotaxis) dieser Zellen beteiligt (Kireeva et al., 1996).

O'Brien und Lau (1992) haben in ihren Untersuchungen mit Mäuseembryonen die gewebespezifische und zeitlich begrenzte Expression des CYR61 Proteins nachgewiesen.

Zusammengenommen liefern die Erkenntnisse über das Expressionsverhalten und die Wirkungen dieses Proteins Hinweise auf die Regulation von Wachstum und Differenzierung unterschiedlicher Zellen im Rahmen von Entwicklungsprozessen (Kireeva et al., 1996).

Die Expression von CYR61 durch Zellen des Gefäßendothels während der Embryonalperiode von Mäusen (O'Brien und Lau, 1992) führt zur Bildung von Gefäßen (Angiogenese) *in vivo* (Babic et al., 1998). In diesem Zusammenhang spielt das CYR61 Protein auch eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Für das Wachstum solider Tumore ist die Neubildung von Gefäßen (Neovaskularisation) besonders bedeutend. Neben anderen Proteinen ist auch CYR61 an der für das Tumorwachstum wichtigen Neovaskularisation von immundefizienten Mäusen beteiligt (Babic et al., 1998).

Zellen, sowohl mesodermaler, als auch neuroektodermaler Herkunft exprimieren CYR61 während sie sich zu Chondrozyten differenzieren (O'Brien und Lau, 1992). Durch weitere Arbeiten wurde die Bedeutung von CYR61 für die Knorpelbildung gezeigt. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen konnte das CYR61 Protein in mesenchymalen Zellen aus Körpergliedanlagen nachgewiesen werden. Neben dem *in vivo* Nachweis gelang auch der *in vitro* Nachweis von CYR61 im Zellkulturexperiment aus isolierten mesenchymalen Zellen der sich entwickelnden Extremitäten. Das CYR61 Protein trägt zur Knorpelbildung bei, indem es die Aggregation der beteiligten Zellen fördert. Untermauert wird der Einfluss auf die Chondrogenese durch die Steigerung der Differenzierungsrate mesenchymaler Zellen in Chondroblasten, welche durch die Expression von Typ II Kollagen belegt ist. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das CYR61 Protein frühe Differenzierungsstufen während der Chondrogenese reguliert. Das Ausmaß der Knorpelbildung in der Zellkultur konnte auch durch die vermehrte Anfärbung mit einem

knorpelspezifischen Farbstoff und die gesteigerte Syntheserate radioaktiv markierter Proteoglykane gezeigt werden. Zellen, die in einer für die Knorpelbildung unterschwelligen Dichte ausgesät werden, durchlaufen die chondrogene Differenzierung unter der Behandlung mit dem CYR61 Protein, was einen weiteren Befund für die chondrogene Wirkung von CYR61 liefert (Wong et al., 1997). Zusätzlich lässt sich das CYR61 Protein auch im hypertrophen Knorpel nachweisen. Unter Berücksichtigung der angiogenen Wirkung von CYR61 könnte dieses Protein an der Neovaskularisation der Knorpelvorlage im Rahmen der enchondralen Ossifikation beteiligt sein (Lau und Lam, 1999).

Für die Wundheilung der Haut sind Interaktionen zwischen Fibroblasten der Haut, Endothelzellen und Makrophagen sowie der EZM ausschlaggebend. Im Granulationsgewebe wird CYR61 durch Fibroblasten exprimiert. CYR61 reguliert die Expression von Genen, die an der Wechselwirkung zwischen diesen Zellen und der EZM involviert sind. Hierzu gehört die Herauf- Regulation von inflammatorischen Zytokinen, Matrixmetalloproteinasen und Zelladhäsionsrezeptoren, sowie die Herunter- Regulation von Typ I Kollagen (Chen et al., 2001).

Die Aufklärung möglicher weiterer Funktionen des CYR61 Proteins bleibt Gegenstand künftiger Untersuchungen.

#### **1.4.4 Integrinrezeptoren**

Die Proteine der CCN Familie gehören zu den mit der EZM assoziierten Molekülen. Sie dienen der Kommunikation zwischen der EZM und der in die Matrix eingelagerten Zellen. Auf diese Weise werden zelluläre Vorgänge wie Anhaftung, Wanderung, Proliferation, aber auch komplexere biologische Prozesse wie die Embryogenese, Angiogenese, Tumormetastasierung, Immunreaktionen oder die Hämostase ermöglicht. Das Spektrum an biologischen Funktionen, sowie die Notwendigkeit divalenter Kationen zur Verwirklichung dieser Aufgaben führte zur Identifizierung unterschiedlicher Integrinrezeptoren als Bindungspartner für CYR61 (Lau und Lam, 1999).

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette bestehen. Sie treten mit einer Vielzahl von Liganden in Wechselwirkung und vermitteln auf diese Weise Zell- Zell- und Zell- Matrix- Interaktionen. Ein Bestandteil zahlreicher Adhäsionsmoleküle der EZM ist eine Tripeptidsequenz aus Arginin- Glycin- Aspartat (RGD). Die Rezeptoren vom Typ der Integrine erkennen dieses RGD- Epitop der Matrixmoleküle und können so ihren Liganden binden (Lau und Lam, 1999).



Das CYR61 Protein bindet direkt an die Integrinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_6\beta_1$  in zellspezifischer Weise (Grzeszkiewics et al., 2001; Babic et al., 1998; Jedsadayanmata et al., 1999; Kireeva et al., 1998; Chen et al., 2001; Chen et al., 2000). Die unterschiedlichen Rezeptoren sind in der Lage die Vielfalt an biologischen Wirkungen des CYR61 Moleküls zu vermitteln. Die Adhäsion und Wanderung von Endothelzellen, sowie die proliferative Wirkung auf Fibroblasten wird durch die Ligandenbindung an den Integrinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$  induziert. An den Wanderungsbewegungen der Fibroblasten ist hingegen der  $\alpha_v\beta_5$ - Rezeptor beteiligt. Die Adhäsion von CYR61 an Blutplättchen erfolgt über den  $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Rezeptor. Weiterhin fördert CYR61 die Adhäsion und die Chemotaxis von glatten Gefäßmuskelzellen durch den Integrinrezeptor  $\alpha_6\beta_1$  im Zusammenspiel mit heperansulfathaltigen Proteoglykanen (HSPG) auf Zelloberflächen. Der Rezeptor  $\alpha_6\beta_1$  ist zusammen mit HSPG auch für die Adhäsion von humanen Fibroblasten verantwortlich.

### **1.5 Ziel der Arbeit**

Das CCN Protein CYR61 besitzt eine Reihe außergewöhnlicher biologischer Funktionen. Als ein Molekül der EZM dient es der Regulation zellulärer Aktivitäten wie Adhäsion, Wanderung und Proliferation. Diese Funktionen stehen im Einklang mit der Wirkung von Proteinen, die Zellwachstum und Differenzierung steuern. Die gewebespezifische und zeitlich begrenzte Expression von CYR61 in Mäuseembryonen lieferte bereits erste Hinweise über eine mögliche Beteiligung an der Entwicklung des Skelettsystems. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde das CYR61 Protein in nachfolgenden Arbeiten als ein neuer, die Chondrogenese regulierender, Faktor identifiziert.

Welchen Einfluss dieses Proteins auf den Knorpelstoffwechsel unterschiedlicher humaner Chondrozytenzelllinien hat wurde Gegenstand neuer Untersuchungen. Dieses Interesse bildete die Grundlage zur Themenstellung der vorliegenden Arbeit. Die Wirkung von CYR61 auf die chondrogene Differenzierung sollte anhand zweier verschiedener Zelllinien (C-28/I2 und T/C-28a2) untersucht werden. Hierbei wurde das Expressionsverhalten von unterschiedlichen Chondrozytenmarkern unter der Wirkung von CYR61 untersucht. Die CYR61-abhängigen Effekte wurden durch RT-PCR nachgewiesen und die Ergebnisse unter serumhaltigen sowie serumreduzierten Versuchsbedingungen hierbei miteinander verglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

	<u>Firmen</u>
Dublecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco
Trypsin	Biochrom- Seromed
RNeasy Mini Kit System	Qiagen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
M-MLV RT 5xPuffer	Promega
dNTP PCR Nucleotit Mix	Promega
Oligo (dT) <sub>15</sub> Primer	Promega
Taq-Polymerase	Amersham
10x PCR Puffer	Amersham
Oligonukleotit Primer für RT-PCR	MWG-Biotech AG
RLT- Puffer	Qiagen
Merkaptoethanol	Sigma

Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Gibco, Sigma, Cambrex und Peqlab bezogen.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

##### 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden zu 500ml Duplecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) 50ml 10%-igen FCS zugegeben, sowie 5ml Pen/Strep (10000 U/ml). Aufbewahrung des Mediums erfolgte bei 4°C.

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an der sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt.

Die Kultivierung der C-28/I2-Zellen, eine Zelllinie humaner Chondrozyten von Dr. V. M. Goldring, USA zur Verfügung gestellt, erfolgte bei 37°C im Brutschrank bei konstantem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5%. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Die Zellen wurden bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad wurden die C-28/I2-Zellen im Zellkulturmedium (DMEM/F12 1:1 mit 10% FCS) in einer 50cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bis kurz vor Konfluenz kultiviert. Zur Zellsplittung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen um abgestorbene Zellen zu entfernen. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen für fünf bis zehn Minuten mit 1,5ml Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur behandelt. Durch Zugabe von 4,5ml Zellkulturmedium wurde die weitere Enzymwirkung unterbunden. Mehrmaliges aspirieren mit der Pipette löste noch vorhandene Zellklumpen auf. Der Flascheninhalt wurde in ein Eppendorfröhrchen gegeben und fünf Minuten bei 1200U/min zentrifugiert. Der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3ml Medium resuspendiert. 300µl wurden zusammen mit 12ml Medium in eine 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend erneut gesplittet.

Bei jedem Mediumwechsel erfolgte die Kontrolle der Zellen auf Vitalität, sowie Keimfreiheit unter dem Mikroskop.

T/C-28a2-Zellen, eine Zelllinie humaner Chondrozyten von Dr. V. M. Goldring, USA zur Verfügung gestellt, wurden unter denselben Bedingungen kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

### **2.2.1.2 Behandlung der Zellen**

In eine 50ml Flasche wurden 1ml der resuspendierten Zellen und 11,5ml Medium pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch mehrmaliges aspirieren homogen verteilt. Aus dieser Zellsuspension wurde jeweils 1ml in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellbehandlung erfolgte mit Beginn des zweiten Tages. Zuerst wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (1ml) und im Anschluss drei Proben einer 6-Well-Platte mit jeweils 1µg/ml CYR61 behandelt. Die anderen drei Proben dienten als Kontrollgruppe. An jedem zweiten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die Behandlung der Zellen.

### **2.2.1.3 Isolierung der Zellen**

Die Isolierung der Zellen erfolgte zu zwei Zeitpunkten. Zum Zeitpunkt der Konfluenz erfolgte jeweils die Isolation einer Probe mit CYR61- behandelten Zellen mit der jeweiligen Kontrolle. Zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage wurden das andere Paar aus behandelten und nicht- behandelten Zellen gewonnen.

Ein Puffer- Ansatz aus 10 ml RLT- Puffer sowie 100 µl Merkaptoethanol wurde vor Isolierung der Zellen vorbereitet. Das Medium aus dem entsprechendem Well wurde abgesaugt und einmal mit 3 ml PBS- Puffer gespült. Jeweils 350 µl vom Puffer- Ansatz wurden in das Well pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden im Anschluss zusammen mit dem Medium in ein Eppendorfröhrchen überführt und bei – 20 °C vor der weiteren Verarbeitung gelagert.

### **2.2.2 Isolierung der RNA**

Zur RNA- Isolierung wurde das RNeasy Mini Protocol der Firma Qiagen verwendet.

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur auf Eis lagernd aufgetaut. Zu den einzelnen Proben bestehend aus 350 µl RLT- Puffer und Zelllysat wurde jeweils 350 µl Ethanol 70 % dazugegeben und mit der Pipette der Inhalt homogen vermischt. Die gesamte Lösung wurde in ein speziell hierfür vorgesehenes Tube überführt und eine Minute bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Inhalt des Sammelröhrchens wurde verworfen, 700 µl RW 1- Puffer auf die Zellsuspension gegeben und erneut eine Minute bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und ein neues verwendet. 500 µl RPE- Puffer auf die Suspension gegeben und eine Minute bei 10000 u/min zentrifugiert und der Inhalt des Sammelröhrchens verworfen. Die Suspension wurde erneut mit 500 µl RPE- Puffer gewaschen und für zwei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Röhrchen mit Inhalt wurde in ein neues Sammelröhrchen gestellt und diesmal eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Röhrchen mit Inhalt wurde in ein neues Sammelröhrchen gestellt, 50 µl RNase freies Aqua dazupipettiert und eine Minute mit 10000 U/min zentrifugiert.

Zur Kontrolle der Reinheit und zur Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde eine photometrische Messung nach dem Auftauen auf Eis durchgeführt. Die Messung erfolgte in HPLC-H<sub>2</sub>O. 2 µl der RNA-Probe wurde zu 48 µl HPLC-H<sub>2</sub>O geben. Als Leerwert wurde 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O verwendet. 50 µl Gesamtvolumen wurde in eine UVette (spezielle Küvette zur Photometrie von Eppendorf) überführt und am Eppendorf-

Biophotometer die RNA- Konzentration bestimmt. Das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis sollte hierbei zwischen 1,6 und 1,9 liegen um eine mögliche Proteinkontamination, das Vorhandensein degradierter RNA bzw. einen Überschuss an freien Nukleotiden auszuschließen.

### **2.2.3 cDNA- Synthese**

Mittels der photometrisch bestimmten RNA- Konzentration wurde der Volumenanteil der jeweiligen Proben entsprechend 1  $\mu\text{g}$  berechnet. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis.

Autoklaviertes HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  wurde in autoklavierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt, so dass zusammen mit dem berechnetem RNA- Volumen der jeweiligen Probe ein Endvolumen von 13  $\mu\text{l}$  erreicht wurde. Anschließend wurde das entsprechende Volumen der RNA- Suspension und zuletzt 1  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) Oligo-dT dazupipettiert. Das Endvolumen der einzelnen Proben entsprach 14  $\mu\text{l}$ . Diese wurden für 10 Minuten bei  $70^\circ\text{C}$  im Heizblock erwärmt und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt. Zwischenzeitlich wurde ein Mastermix entsprechend der Anzahl der Proben + 1 hergestellt. Für eine Probe wurden 4  $\mu\text{l}$  M-MLV RT 5x Puffer, 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP (Nucleotid Mix) und 1  $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transkriptase verwendet und kurz gevortext. Jeweils 6  $\mu\text{l}$  des Mastermix wurden zu den einzelnen Proben dazupipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  ergab. Die Proben wurden für 60 Minuten bei  $42^\circ\text{C}$  im Heizblock erwärmt und schließlich noch für zehn Minuten bei  $70^\circ\text{C}$  zur Enzymaktivierung. Zum Schluss wurde noch jeweils 30  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  zu den Proben dazupipettiert und die cDNA bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.4 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Vorbereitend wurde aus den Primerstocklösungen 100 pmol/ $\mu\text{l}$  eine 1:20 Verdünnung hergestellt (95  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  + 5  $\mu\text{l}$  Primer-Stocklösung). Für den PCR Ansatz wurde ein Mastermix angesetzt. Entsprechend einer cDNA-Probe wurde je 1  $\mu\text{l}$  eines Primerpaares (Sense, Antisense), 1  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM), 3  $\mu\text{l}$  10x PCR- Puffer, 0,5  $\mu\text{l}$  Taq- Polymerase (5000 U/ml) und 22,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  vorbereitet und gevortext. Je 1  $\mu\text{l}$  Template der cDNA- Proben wurde in PCR-Tubes vorgelegt und diese mit 29  $\mu\text{l}$  des Mastermix aufgefüllt.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1:	94°C für 4 Minuten	
Schritt 2:	94°C für 30 Sekunden	} Y Zyklen
Schritt 3:	X°C für 1 Minute	
Schritt 4:	72°C für 1 Minute	
Schritt 5:	72°C für 5 Minuten	

Je nach Primerpaar wurde eine entsprechend Annealing-Temperatur „X°C“, sowie eine bestimmte Zyklenzahl „Y“ verwendet.

Durchgeführt wurde die RT-PCR in dem Multi Cycler PTC 200 von MJ Research.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR- Produkte bei - 20°C gelagert.

### 2.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Die PCR- Produkte wurden auf ein 1,5%- iges Agarose- Gel aufgetragen.

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Reagenzien verwendet:

1,5 g Agarose

10x TBE- Puffer → 108 g Trishydroxymethylaminomethan + 55 g Borsäure + 9,05 g EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat =  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ) ad 1000 ml  $H_2O$ , pH-Wert auf 8,3 eingestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert

5 µl Ethidiumbromid/100 ml Gellösung

1,5g Agarose wurden in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 0,5x TBE- Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt und mit 5 µl Ethidiumbromid/100 ml Gellösung versetzt.

Nach Erhitzen der Gels in der Laufkammer wurde dieses mit 0,5x TBE aufgefüllt und jeweils 9 µl der Proben, welche mit 1 µl 10x Ladungspuffer versetzt wurden, in den einzelnen Geltaschen aufgetragen. Bei 145V und einer 20 minütigen Laufzeit wurde die cDNA elektrophoretisch aufgetrennt.

Zum Größenvergleich diente ein 100 bp Größenstandard (100 bp DNA Leiter, Kit Firma PECLAB Biotechnologie GmbH).

Mittels der Software BioCaptMW wurden die einzelnen Gele unter UV-Licht aufgenommen und abgespeichert.

### **2.2.6 Densitometrie**

Die densitometrische Auswertung der einzelnen digitalisierten Banden erfolgte am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D. Quantifiziert wurde jeweils das Volumen der PCR-Produkte und auf das GAPDH PCR-Produkt normalisiert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Einleitung**

Die Wirkung von CYR61 auf die chondrogene Differenzierung zweier humaner Chondrozytenzelllinien (T/C-28a2-Zellen und C-28/I2-Zellen) wurde anhand der Expression chondrogener Marker untersucht. Zu diesen gehörten verschiedene Kollagene, sowie Proteoglykane. Nach Kultivierung der Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen, serumhaltig/-reduziert und mit CYR61 behandelt/nicht behandelt, wurde nach Ernte der Zellen der RNA-Gehalt jeder Probe bestimmt und die zugehörige cDNA geschrieben. Im Anschluss an die RT-PCR mit Primern für die verschiedenen Marker wurden die Bandenstärken der RT-PCR-Produkte densitometrisch bestimmt und in Bezug gesetzt zu GAPDH bzw. EF-1 $\alpha$ .

#### **3.2 Primerliste und PCR-Bedingungen**

Die Auswahl der verwendeten Kollagene und Proteoglykane orientierte sich an der Expression und schließlich an der Biosynthese einzelner Markerproteine der chondrogenen Differenzierung. Das Expressionsverhalten dieser Marker unter CYR61-Behandlung sollte Gegenstand der Untersuchung werden.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war die Spezifität der RT-PCR durch sequenzieren des Produktes überprüft worden.

Die im Folgenden Verwendeten Primer und die PCR-Bedingungen sind in den Tab. 1 und 2 zusammengefasst.



Tab. 1) Primer, Annealing-Temperatur und Zyklenzahl

Primer	Annealing-Temperatur in °C	Zyklenzahl
Kollagen I	54	27
Kollagen II	58	30
Kollagen III	58	29
Kollagen XI	57	34
Aggrecan	54	35
Biglycan	53	42
Chondroadhaerin	51	33
Decorin	55	35
Fibromodulin	54	30
Versican	51	38
EF-1 $\alpha$	54	24
GAPDH	62	24

Legende zu Tab. 1) Dargestellt sind alle verwendeten Primer, sowie die entsprechende Annealing-Temperatur und Zyklenzahl für die RT-PCR

Tab. 2) Primer, Primersequenzen und Position der Primer

Primer	Primersequenz	Primerposition
Kollagen I	Forward: 5'-GGACACAATGGATTGCAAGG-3' Reverse: 5'-TAACCACTGCTCCACTCTGG-3'	460 bp
Kollagen II	Forward: 5'-GAACATCACCTACCACTGCAAG-3' Reverse: 5'-GCAGAGTCCTAGAGTGAAGT-3'	387 bp
Kollagen III	Forward: 5'-AGGTCCTGCGGGTAACACT-3' Reverse: 5'-ACTTTCACCCTTGACACCCTG-3'	227 bp
Kollagen XI	Forward: 5'-ACTTCTGACTGCCTCTGCTC-3' Reverse: 5'-GCTTTTGCCATGTGATTCTGCC-3'	494 bp
Aggrecan	Forward: 5'-GCCTTGAGCAGTTCACCTTC-3' Reverse: 5'-CTCTTCTACGGGGACAGCAG-3'	391 bp
Biglycan	Forward: 5'-ACAGTGGCTTTGAACTGGA-3' Reverse: 5'-TCATCCTGATCTGGTTGTGG-3'	212 bp
Chondro- adhaerin	Forward: 5'-ACCTGGACCAACAAGGTC-3' Reverse: 5'-CACCTTCTCCAGGTTGGTGT-3'	388 bp
Decorin	Forward: 5'-ATGCCATCTTCGAGTGGTCC-3' Reverse: 5'-ATCCTGAGCTCTTCAGCGG-3'	395 bp
Fibro- modulin	Forward: 5'-ACCAGTGATAAGGTGGGCAG-3' Reverse: 5'-AAGTAGCTATCGGGGACGGT-3'	367 bp
Versican	Forward: 5'-GCGCCACCCTGTGAC-3' Reverse: 5'-CAGTGGTAACGAGATGCTTC-3'	350 bp
EF-1 $\alpha$	Forward: 5'-AGGTGATTATTCTGAACCATCC 3' Reverse: 5'-AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC-3'	234 bp
GAPDH	Forward: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' Reverse: 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'	419 bp

Legende zu Tab. 2) Dargestellt sind alle verwendeten Primer, die zugehörigen Sequenzen und Primerpositionen

### 3.3 Darstellung der Gelelektrophorese und der densitometrischen Auswertung

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Primer, sowie die beiden untersuchten Zelllinien mit den jeweiligen Zellkulturbedingungen, serumreduziert (0,5% FCS) und serumhaltig (10% FCS), dargestellt. Die Versuche für die C-28/I2-Zellen wurden je dreimal wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten Versuchsbedingungen. Die beiden Versuchsreihen für die T/C-28a2-Zellen fanden nur unter serumhaltigen (10% FCS) Bedingungen statt. Für die gelelektrophoretische Darstellung

wurde jeweils eine Abbildung exemplarisch verwendet. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte densitometrisch. Hierbei wurde die Bandenstärke der jeweiligen PCR-Produkte innerhalb einer Experimentenreihe verglichen. Das gemessene Volumen der einzelnen Banden wurde anhand der Signale des GAPDH PCR-Produktes normiert, wobei der erste Wert für GAPDH gleich 100% gesetzt wurde und im Anschluss die Volumenstärken der einzelnen Banden in % (normierte Prozentwerte) von diesem angegeben wurden. Die Ergebnisse wurden schließlich graphisch dargestellt.

Ziel war es festzustellen, inwieweit die chondrogene Differenzierung unter Behandlung mit CYR61 beeinflusst wurde und somit Marker-RNA zu bestimmten definierten Zeiten, Zellen bei Konfluenz (im Folgenden als T<sub>0</sub> bezeichnet) und postkonfluente Zellen (Konfluenz + 3 Tage, im Folgenden als T<sub>+3</sub> bezeichnet) unterschiedlich exprimiert waren.

### **3.3.1 Kollagen I**

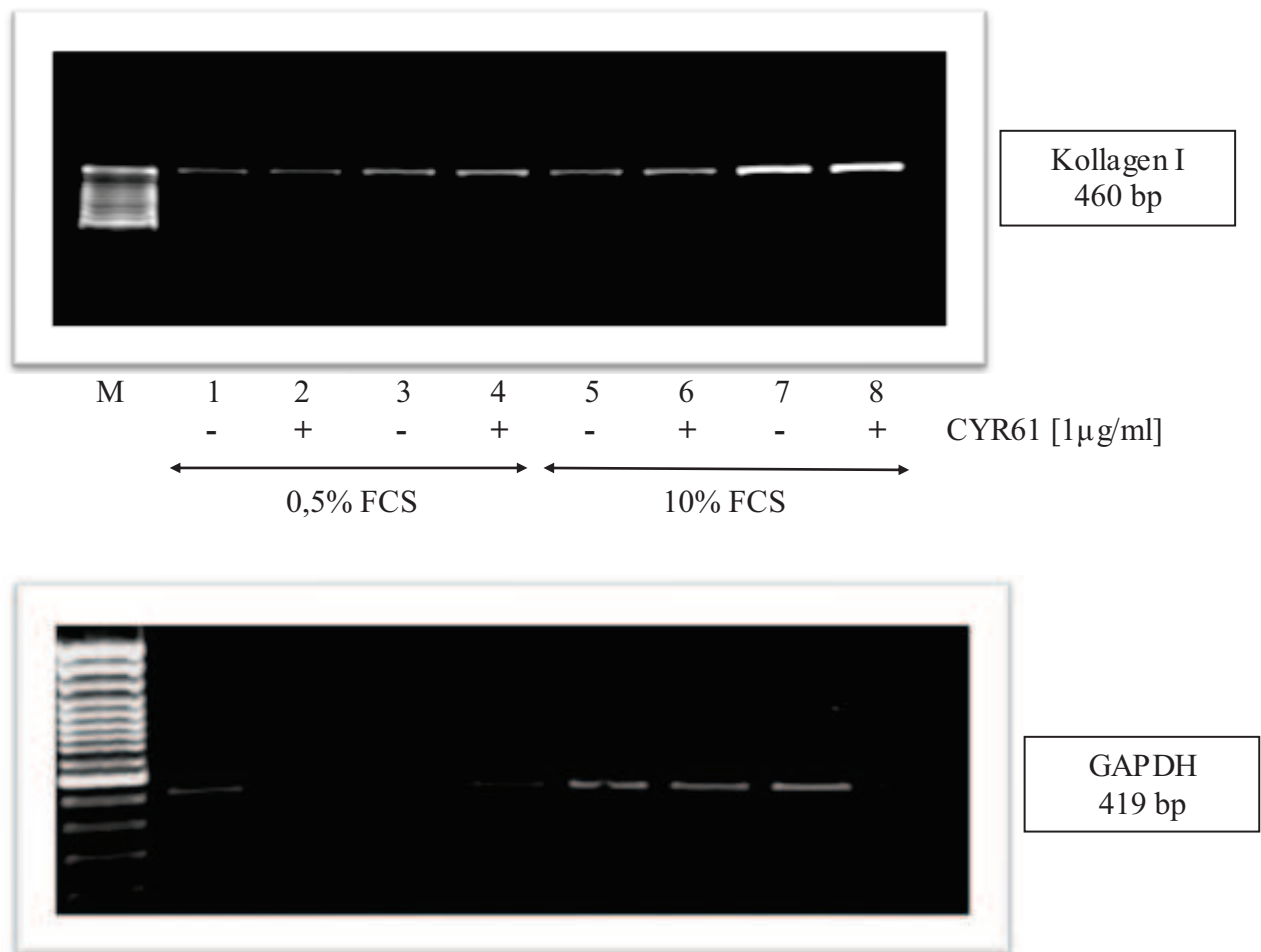
#### **3.3.1.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Versuchsbedingungen wurde zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> jeweils eine leichte Abnahme der Bandenintensität unter CYR61-Behandlung und zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> jeweils eine leichte Zunahme der Bandenintensität unter CYR61-Behandlung nachgewiesen. Der unter CYR61-Behandlung erzielte Effekt konnte unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen in einem weiteren Experiment gezeigt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 2a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Kollagen I. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 2b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

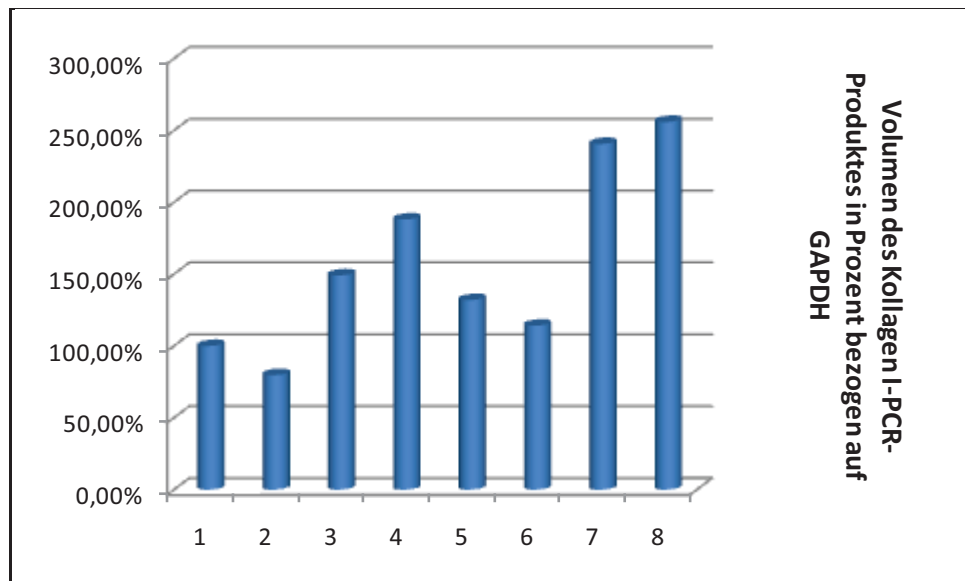
Abb. 2a) Kollagen I und GAPDH



Legende zu Abb. 2a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Kollagen I und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T0 sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T0) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 2b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 2a



Legende zu Abb. 2b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 2a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 2a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.2 Kollagen II**

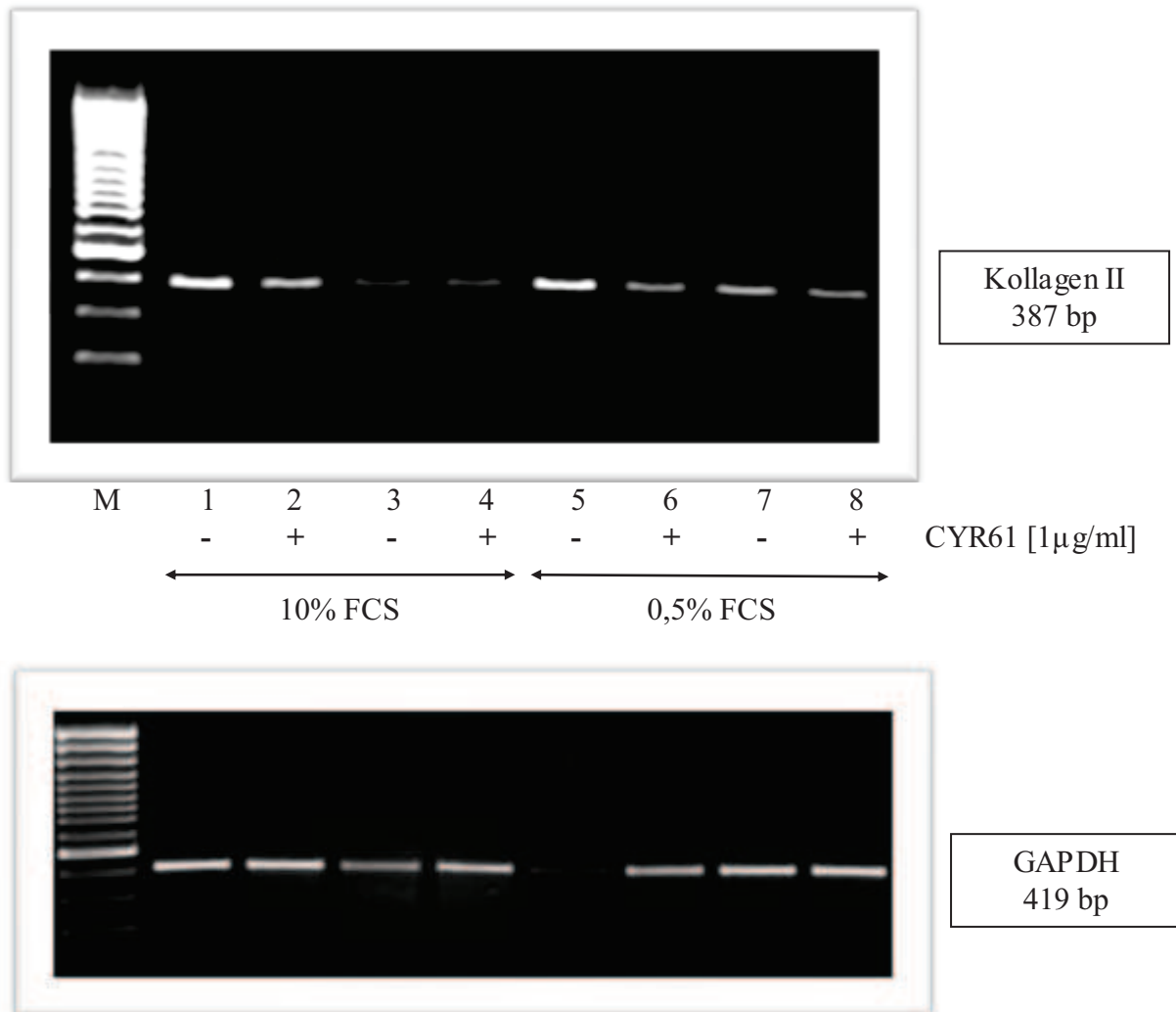
#### **3.3.2.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumhaltigen (10% FCS) und serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen wurde zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> eine verminderte Bandenintensität in der durch CYR61 behandelten Gruppe beobachtet. Zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> wurde in der serumreduzierten (0,5% FCS) Gruppe im CYR61 behandelten Experiment ein vermindertes Volumen des PCR-Produktes für Kollagen II quantifiziert. Diese Effekte konnten je zweifach bestätigt werden. Die unter serumhaltigen (10% FCS) Kulturbedingungen durchgeführte Versuchsreihe stellte im Verhältnis der Bandenintensitäten zwischen den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>+3</sub> eine verminderte Intensität in der Bandenstärke zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> in zwei Experimenten dar. Der Vergleich der Zeitpunkte T<sub>0</sub> zwischen der serumhaltigen (10% FCS) und der serumreduzierten (0,5% FCS) Versuchsgruppe ergab verhältnismäßig eine gleiche Bandenintensität in der nicht CYR61 behandelten Versuchsreihe und eine leichte Zunahme in der CYR61 behandelten Versuchsreihe unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen, was sich in zwei Versuchen wiederholte.

Die folgende Abbildung (Abb. 3a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Kollagen II. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

Abb. 3a) Kollagen II und GAPDH

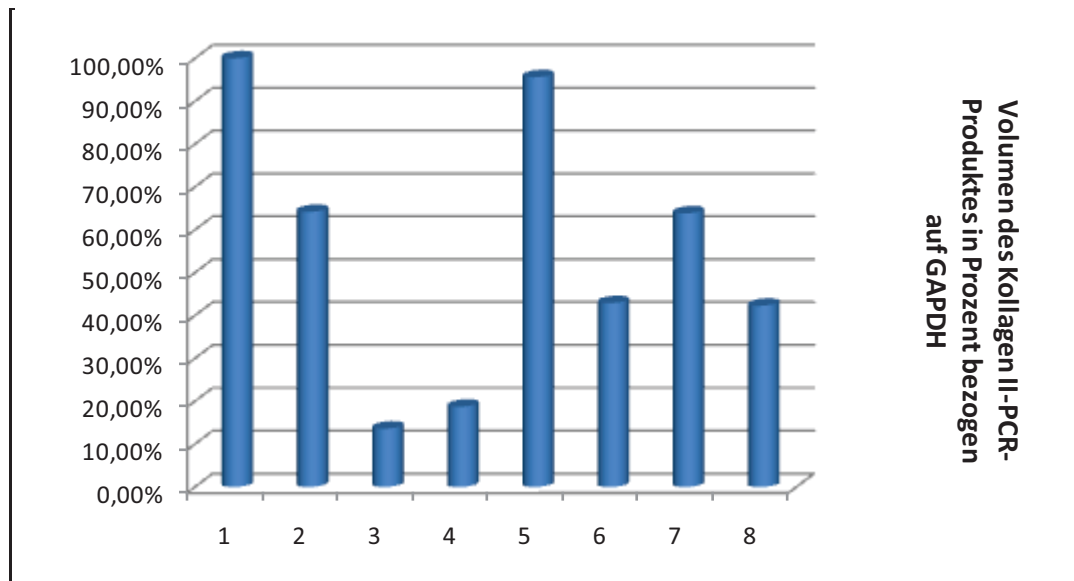


Legende zu Abb. 3a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Kollagen II und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) und die Proben 5-8 unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/12-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T0 sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T0) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).



Abb. 3b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 3a



Legende zu Abb. 3b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 3a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 3a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### 3.3.3 Kollagen III

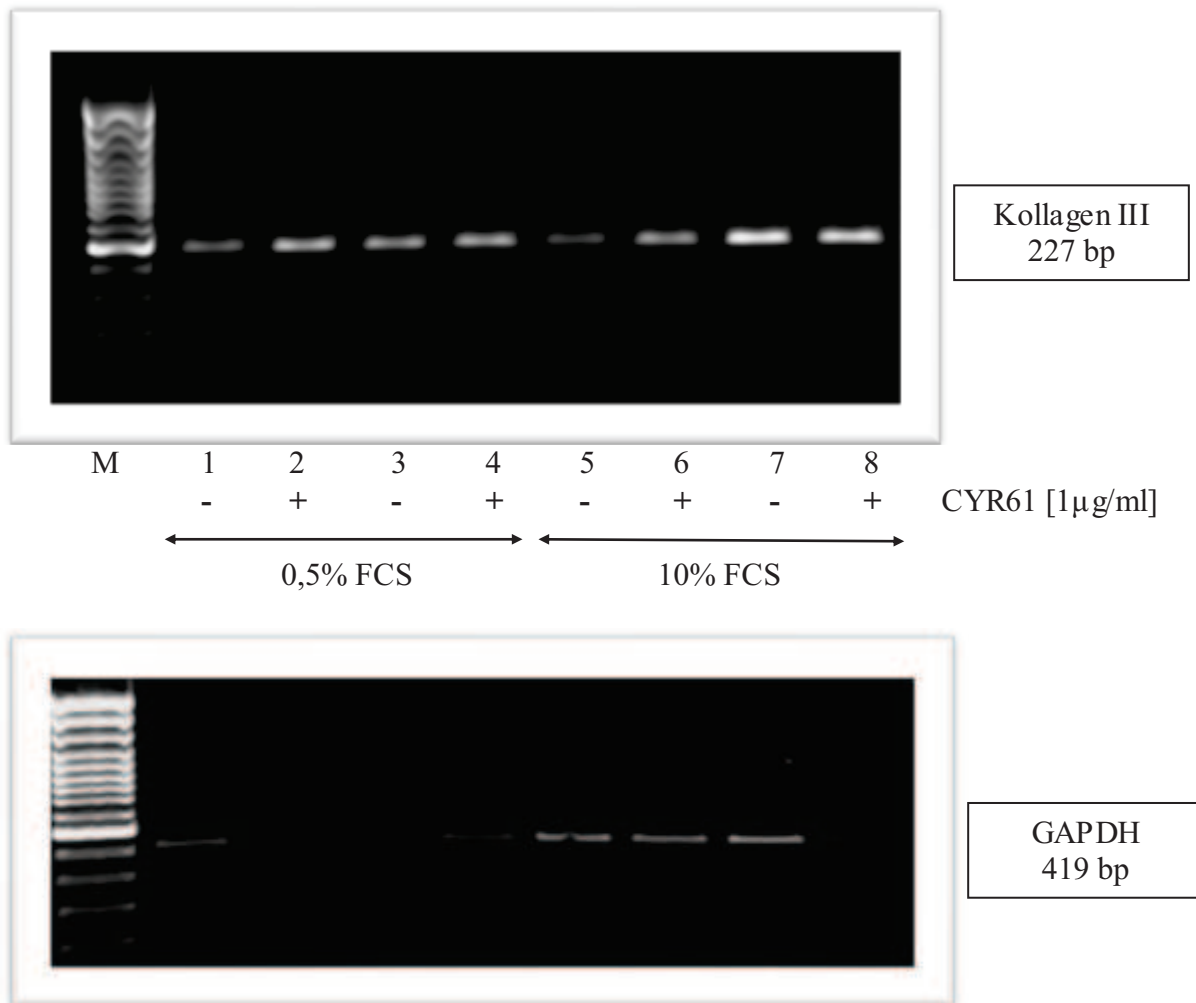
#### 3.3.3.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> wurde eine Zunahme der Bandenintensität unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durch Behandlung der Zellen mit CYR61 beobachtet. Der Effekt unter serumhaltigen (10% FCS) Kulturbedingungen konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Die vermehrte Bandenintensität in der CYR61 behandelten Zellgruppe unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> konnte in zwei Versuchen nachgewiesen werden. Eine Abnahme der Bandenintensität unter CYR61-Behandlung in serumhaltigen (10% FCS) Kulturbedingungen zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> konnte in einem weiteren Experiment dargestellt werden. In zwei Experimenten wurde in der serumreduzierten (0,5% FCS) Versuchsreihe jeweils eine vermehrte Bandenintensität in den postkonfluenten Zellen zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub>, sowohl für die nicht behandelten, als auch für die CYR61 behandelten Zellen nachgewiesen. In denselben beiden Experimenten ergab sich unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen eine Zunahme der Bandenintensität zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> in den nicht CYR61 behandelten Zellen. Der Vergleich der Bandenstärken zwischen den serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zu den verschiedenen Zeitpunkten legte zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> eine Abnahme der Bandenintensität in der serumhaltigen (10% FCS) Versuchsreihe offen. Dies konnte in einem weiteren Experiment für die nicht mit CYR61 behandelten Zellen auch gezeigt werden. Zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> wurde in der serumhaltigen (10% FCS) Versuchsreihe für die mit CYR61 behandelten Zellen in zwei Experimenten eine Abnahme der Bandenintensität gesehen.

Die folgende Abbildung (Abb. 4a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Kollagen III. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 4b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

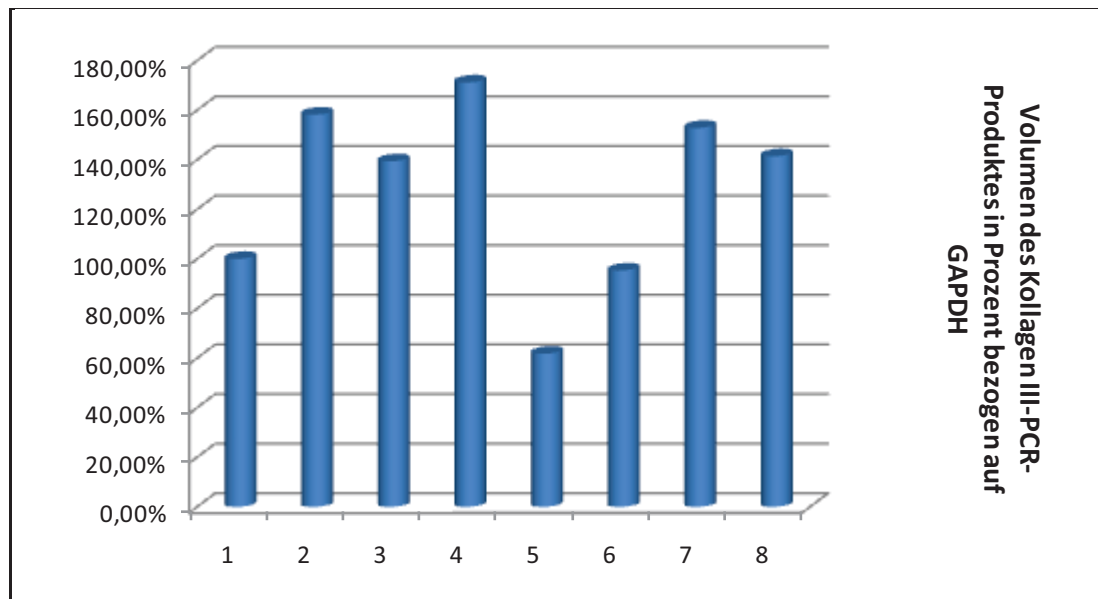
Abb. 4a) Kollagen III und GAPDH



Legende zu Abb. 4a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Kollagen III und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 4b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 4a



Legende zu Abb. 4b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 4a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 4a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

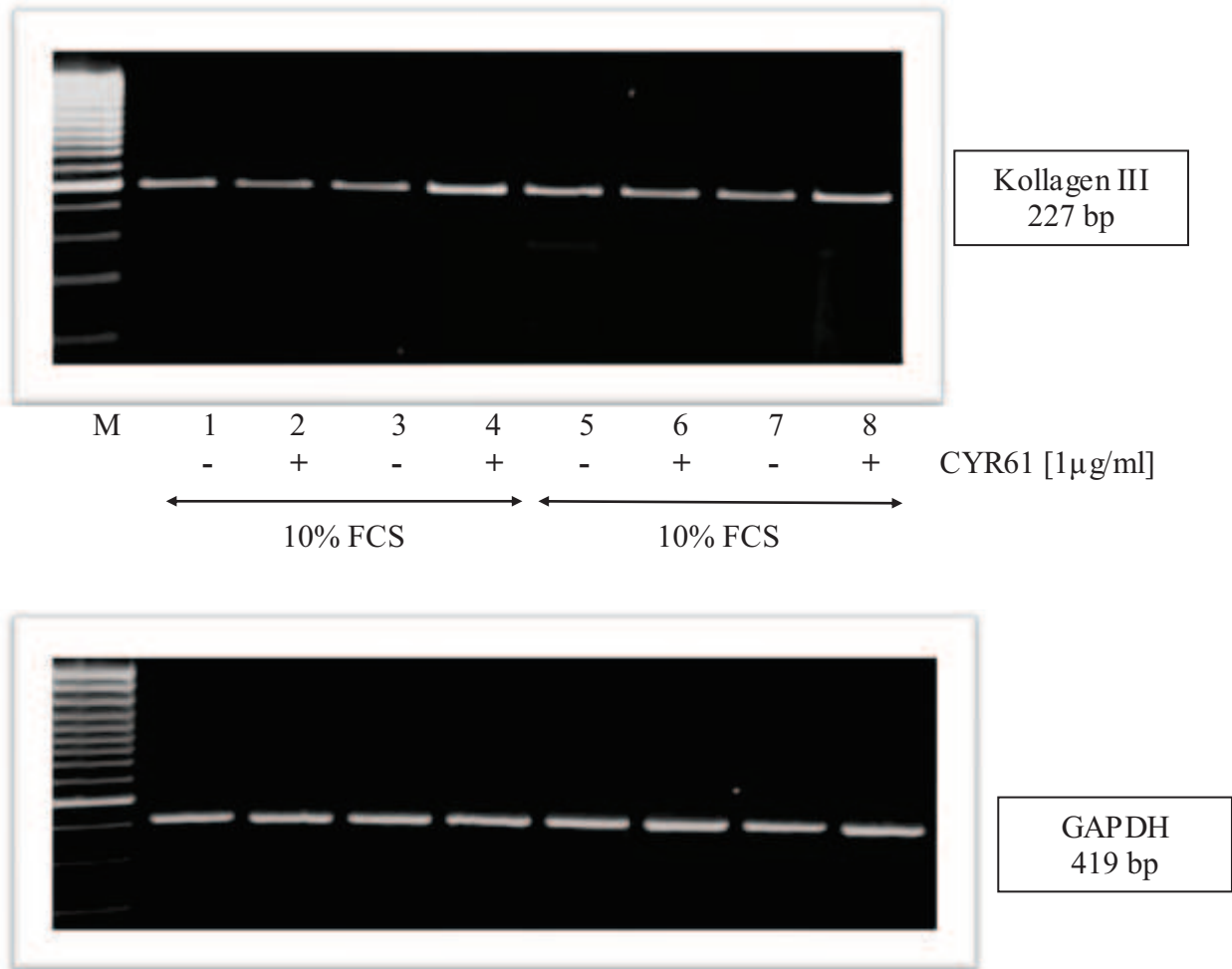
### 3.3.3.2 Versuche für die T/C-28a2-Zellen

Die Experimente für die T/C-28a2-Zellen wurden unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden zweimal wiederholt.

Zum Zeitpunkt  $T_0$  nimmt die Menge des PCR-Produktes für Kollagen III in den CYR61-behandelten Zellen in beiden Experimente ab. Zum Zeitpunkt  $T_{+3}$  ist eine Zunahme der Bandenstärke in den CYR61-behandelten Zellen zu beobachten, welche im zweiten Experiment jedoch nicht so deutlich ausfällt. In den postkonfluenten Zellen zum Zeitpunkt  $T_{+3}$  stellte sich eine vermehrte Bandenintensität in den CYR61-behandelten Zellen im Vergleich zu den behandelten Zellen zum Zeitpunkt  $T_0$  dar.

Die folgende Abbildung (Abb. 5a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Kollagen III. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 5b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

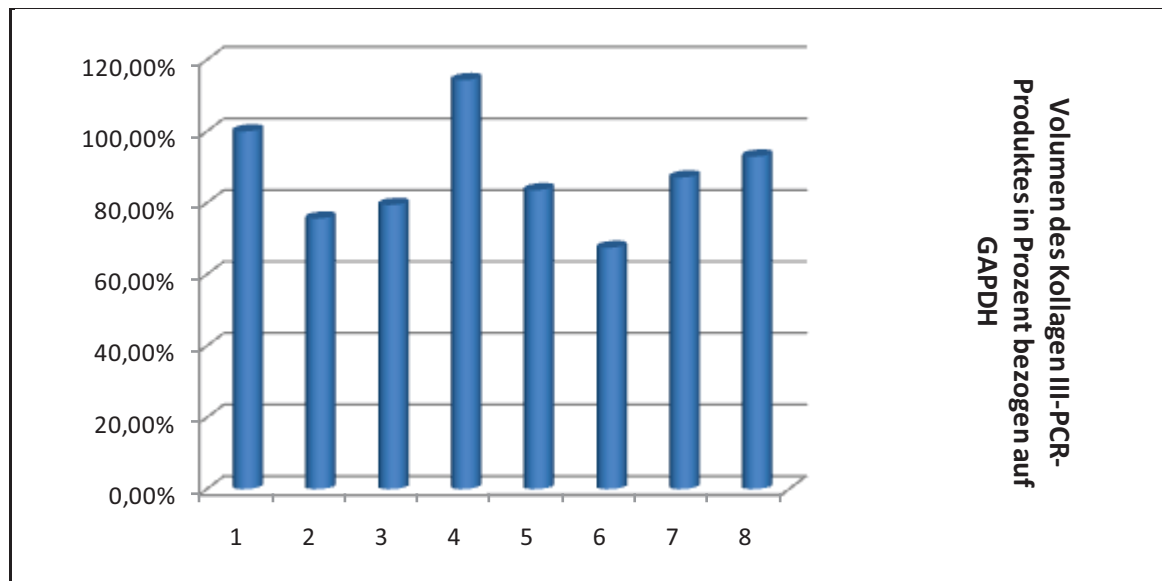
Abb. 5a) Kollagen III und GAPDH



Legende zu Abb. 5a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Kollagen III und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-8 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die T/C-28a2-Zellen wieder. Die Proben 1-4 entsprechen dem ersten Experiment, die Proben 5-8 dem zweiten Experiment. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 5b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 5a



Legende zu Abb. 5b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 5a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 5a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.4 Kollagen XI**

#### **3.3.4.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

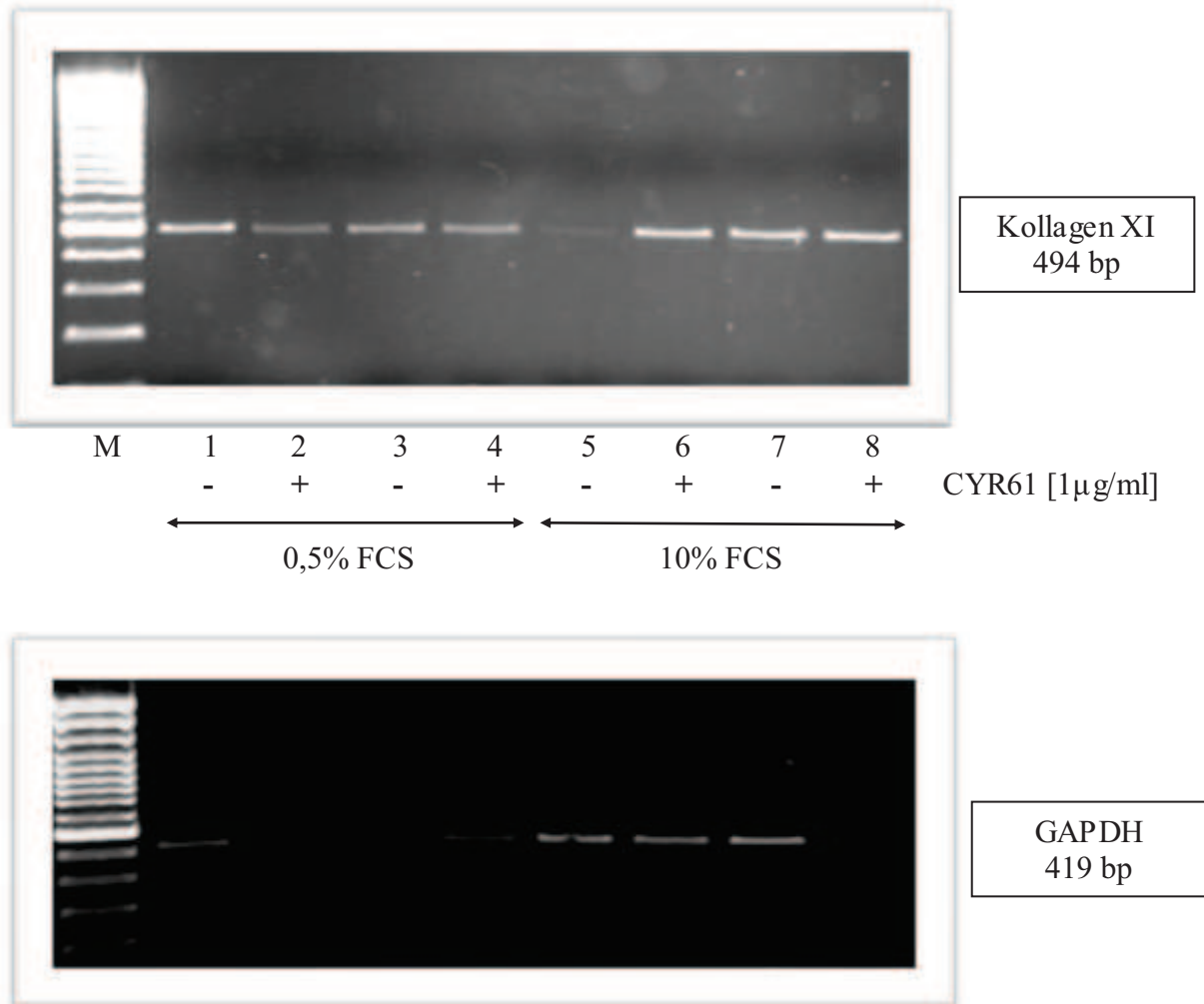
Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen nimmt zum Zeitpunkt  $T_0$  die Bandenstärke unter CYR61-Behandlung ab. Dieser Effekt konnte in einem weiteren Experiment nachgewiesen werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 6a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Kollagen XI. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 6b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.



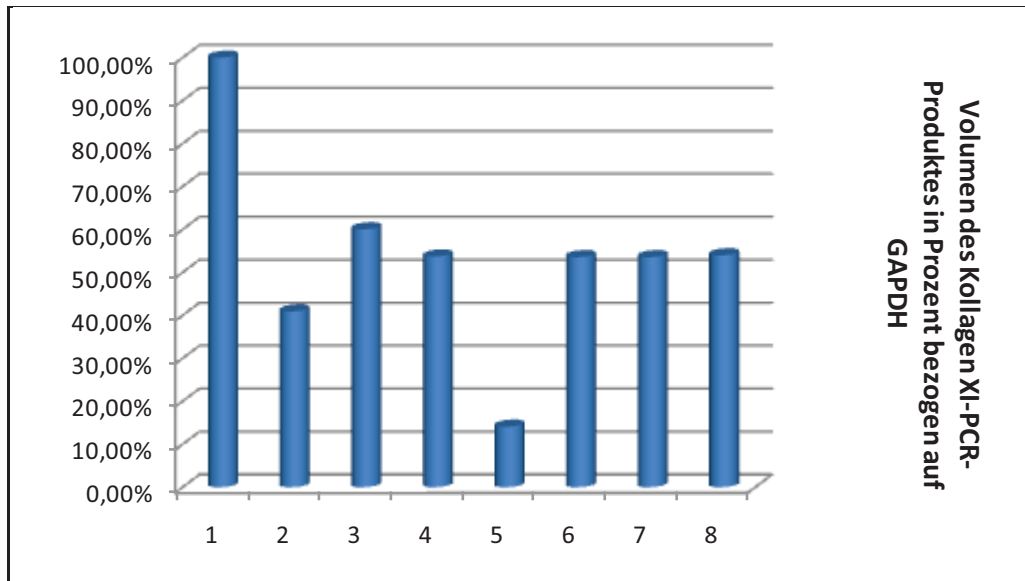
Abb. 6a) Kollagen XI und GAPDH



Legende zu Abb. 6a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Kollagen XI und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 6b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 6a



Legende zu Abb. 6b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 6a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 6a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.5 Aggrecan**

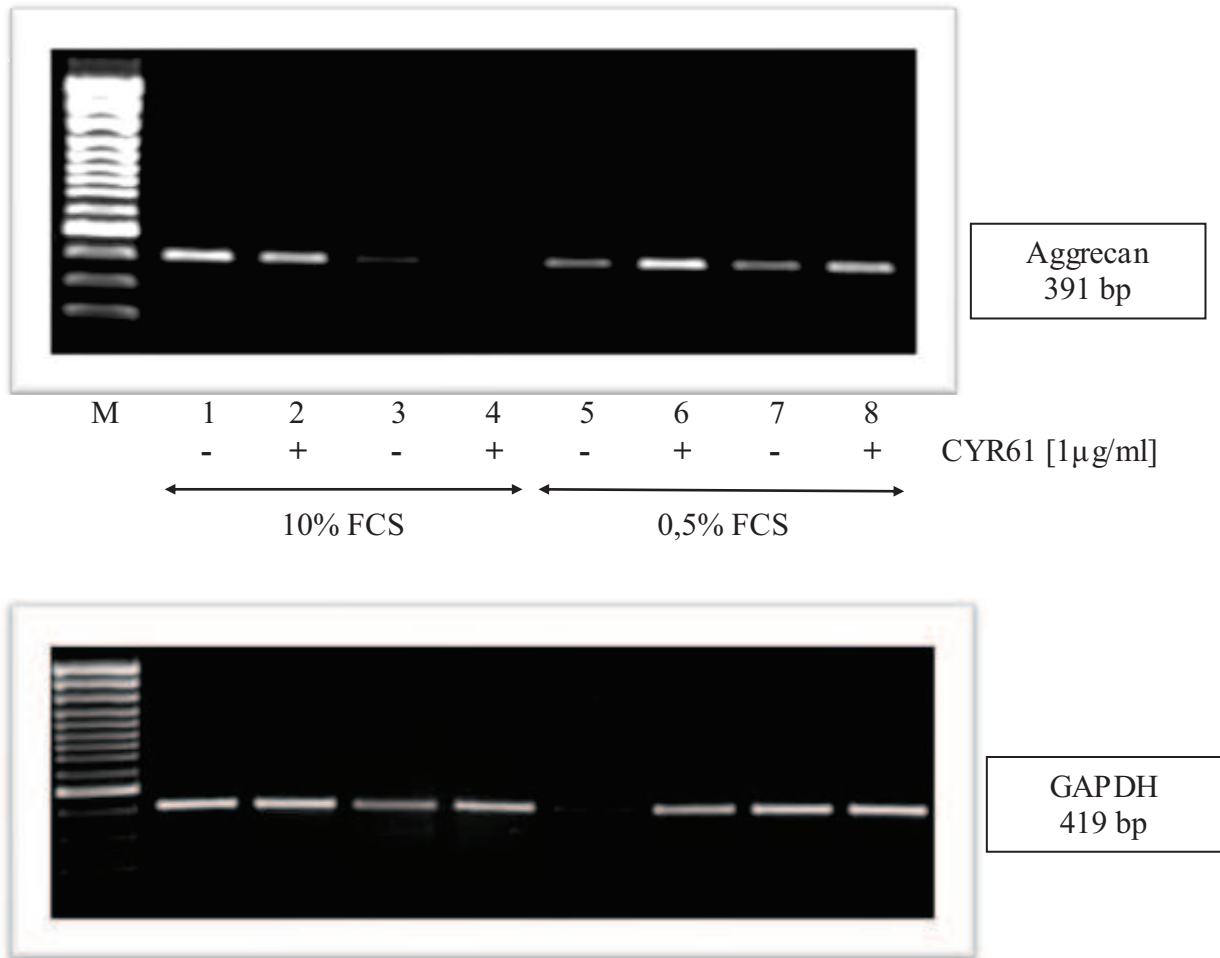
#### **3.3.5.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Zum Zeitpunkt T+3 ließ sich unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen eine Abnahme der Bandenintensität unter CYR61-Behandlung und eine Zunahme der Bandenstärke unter CYR61-Behandlung unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen erkennen. Diese Effekte konnten in einem weiteren Experiment nachgewiesen werden. Die Abnahme der Bandenintensität unter serumhaltigen (10% FCS) Kulturbedingungen zum Zeitpunkt T+3 im Vergleich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> konnte in zwei Experimenten bestätigt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 7a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Aggrecan. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 7b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

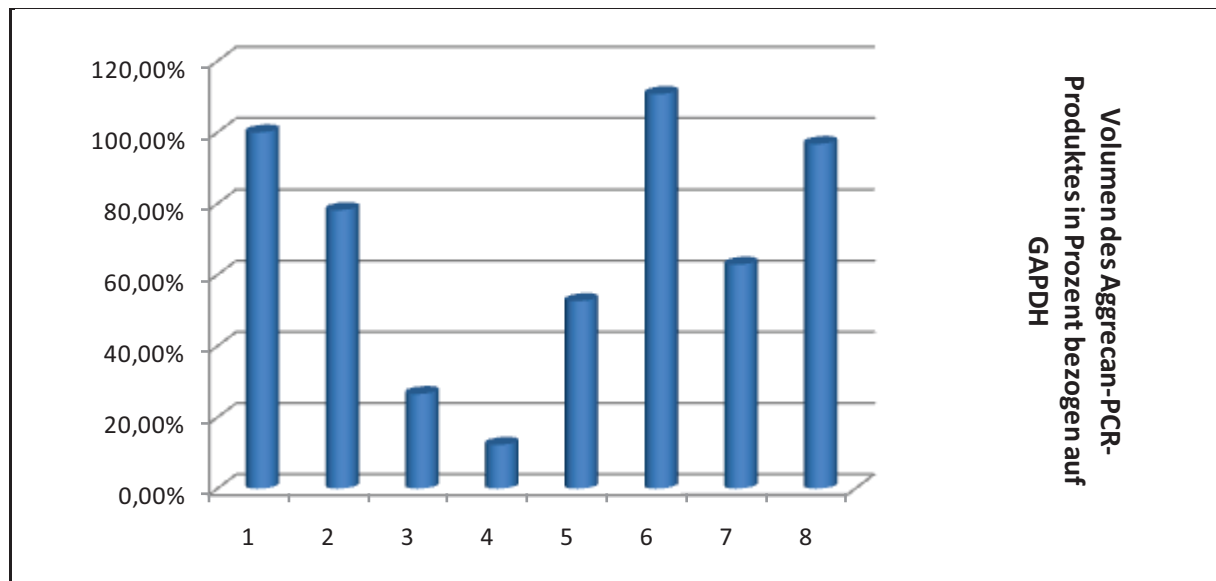
Abb. 7a) Aggrecan und GAPDH



Legende zu Abb. 7a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Aggrecan und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) und die Proben 5-8 unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 7b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 7a



Legende zu Abb. 7b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 7a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 7a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.6 Biglycan**

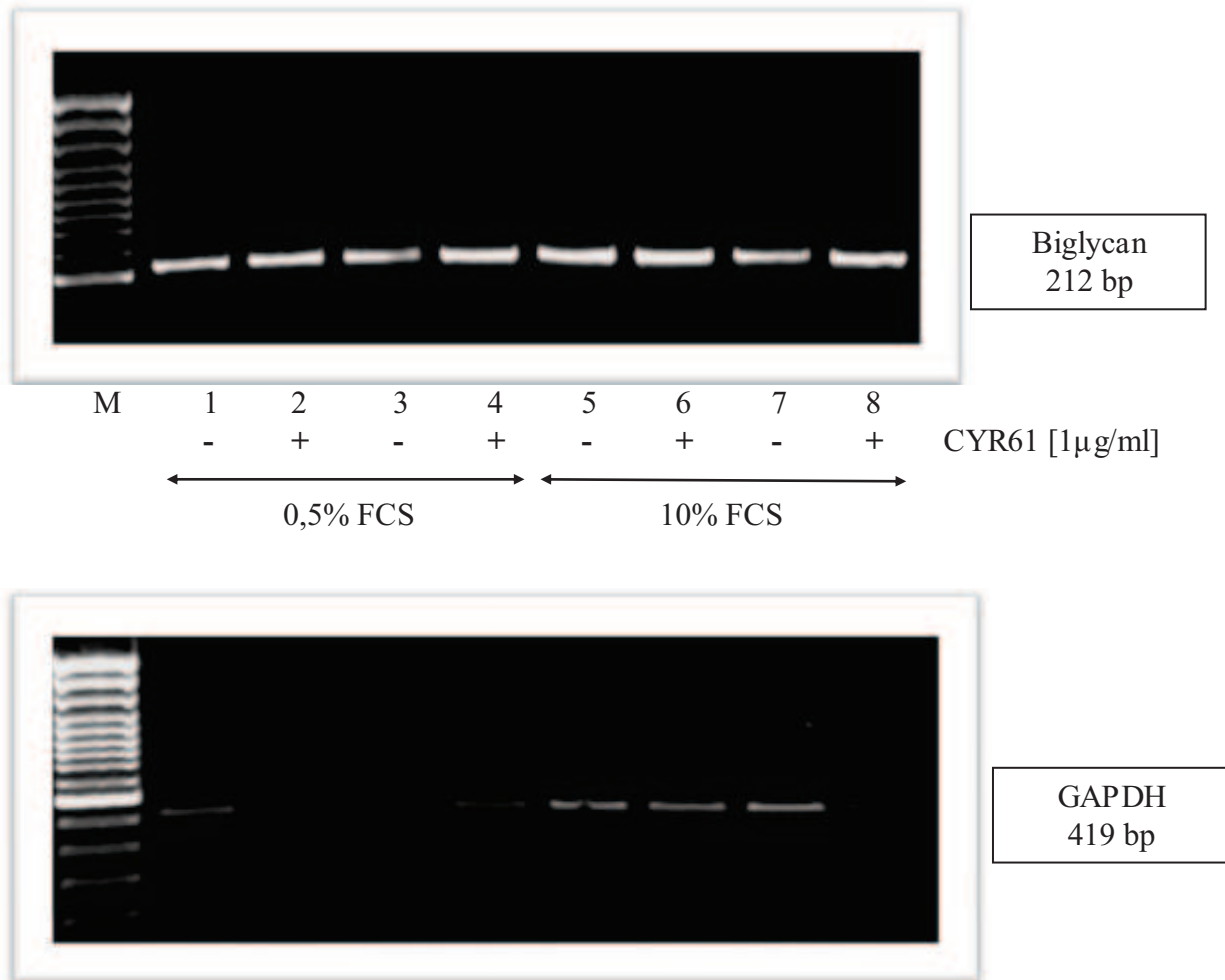
#### **3.3.6.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zeigte sich in zwei Experimenten zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> eine Abnahme der Bandenintensität unter CYR61-Behandlung und eine Zunahme der Bandenintensität zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> in den CYR61 behandelten Zellen. In der serumreduzierten (0,5% FCS) Zellgruppe wurde zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> eine Zunahme der Bandenintensität unter Behandlung mit CYR61 gesehen ebenso wie in einem weiteren Experiment nachgewiesen werden konnte. Die Zunahme der Bandenintensität zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> im Vergleich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> in der serumreduzierten (0,5% FCS) Zellgruppe für die CYR61 behandelten Zellen konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 8a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Biglycan. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 8b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

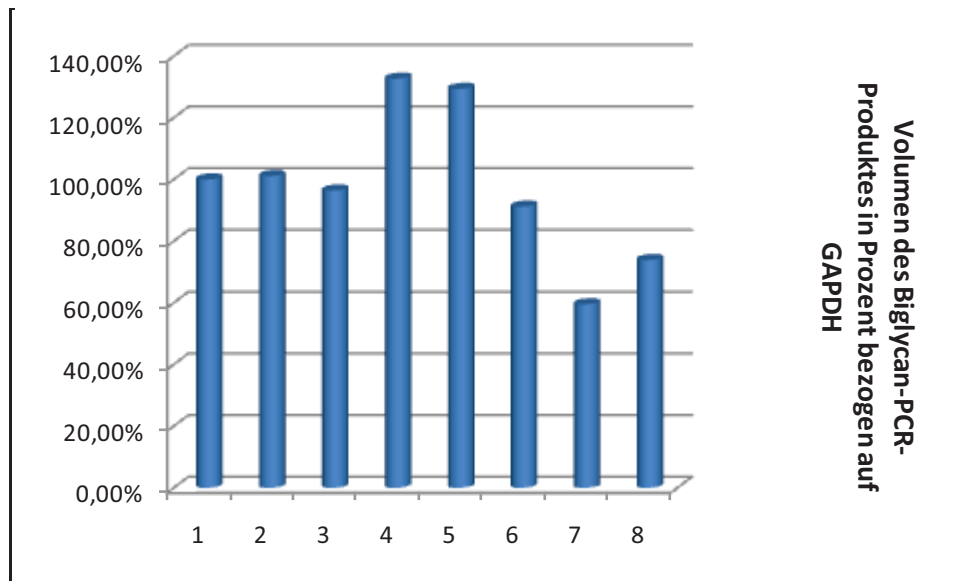
Abb. 8a) Biglycan und GAPDH



Legende zu Abb. 8a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Biglycan und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 8b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 8a



Legende zu Abb. 8b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 8a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 8a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.



### **3.3.7 Chondroadherin**

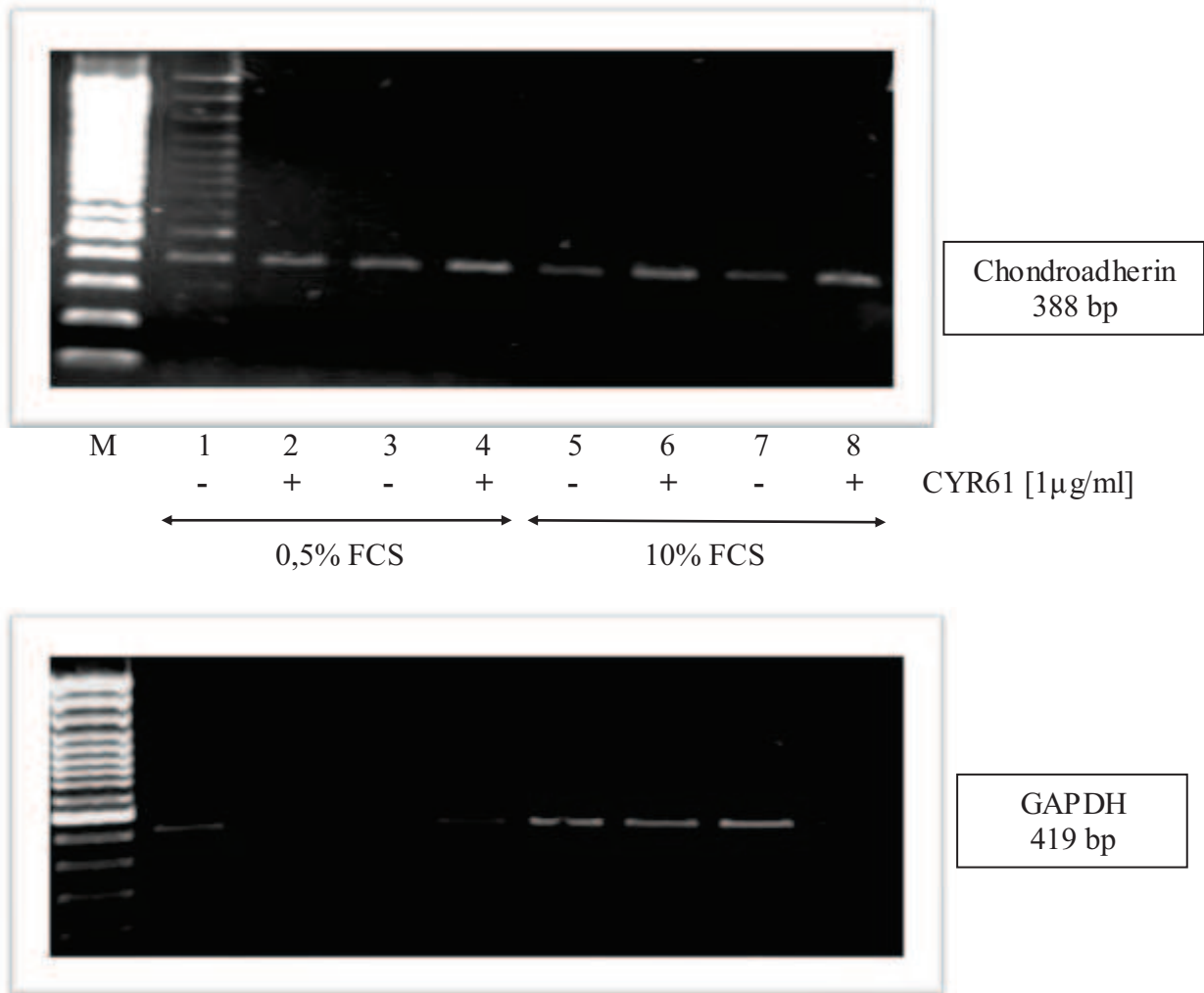
#### **3.3.7.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen wurde zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> eine Abnahme der Bandenstärke in den CYR61- behandelten Zellen beobachtet. Zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> wurde eine Zunahme der Bandenintensität in den CYR61- behandelten Zellen nachgewiesen. Der Effekt zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen wurde zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> eine Zunahme der Bandenintensität in den CYR61- behandelten Zellen in zwei Experimenten dargestellt. Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen stellte sich in den nicht mit CYR61 behandelten Zellen eine verminderte Bandenintensität zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> im Vergleich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> heraus. In den CYR61- behandelten Zellen zeigte sich eine vermehrte Bandenintensität zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> im Vergleich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. Diese Effekte konnten in allen drei unter serumreduzierten (0,5% FCS) Bedingungen durchgeführten Experimenten gezeigt werden. Der Vergleich der Bandenintensitäten unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> legte sowohl für die mit CYR61 behandelten, als auch die mit CYR61 nicht behandelten Zellen eine verminderte Bandenintensität für die serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen dar.

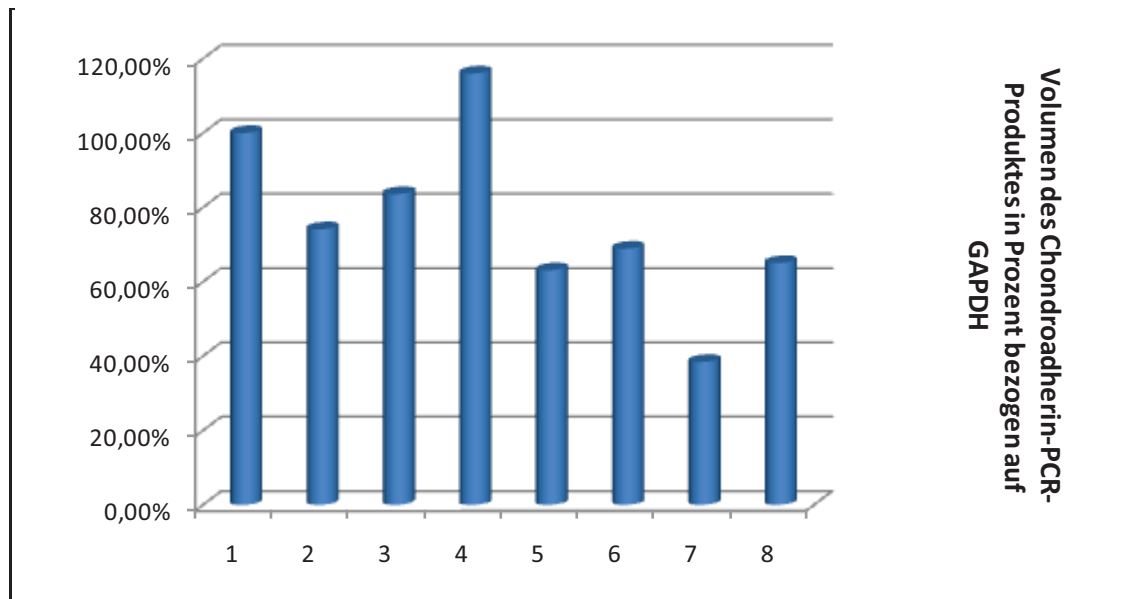
Die folgende Abbildung (Abb. 9a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Chondroadherin. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 9b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

Abb. 9a) Chondroadherin und GAPDH



Legende zu Abb. 9a) Gelelektrophoretische Darstellung des PCR-Produktes für Chondroadherin und GAPDH: M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T0 sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und ehandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T0) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 9b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 9a



Legende zu Abb. 9b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 9a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 9a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

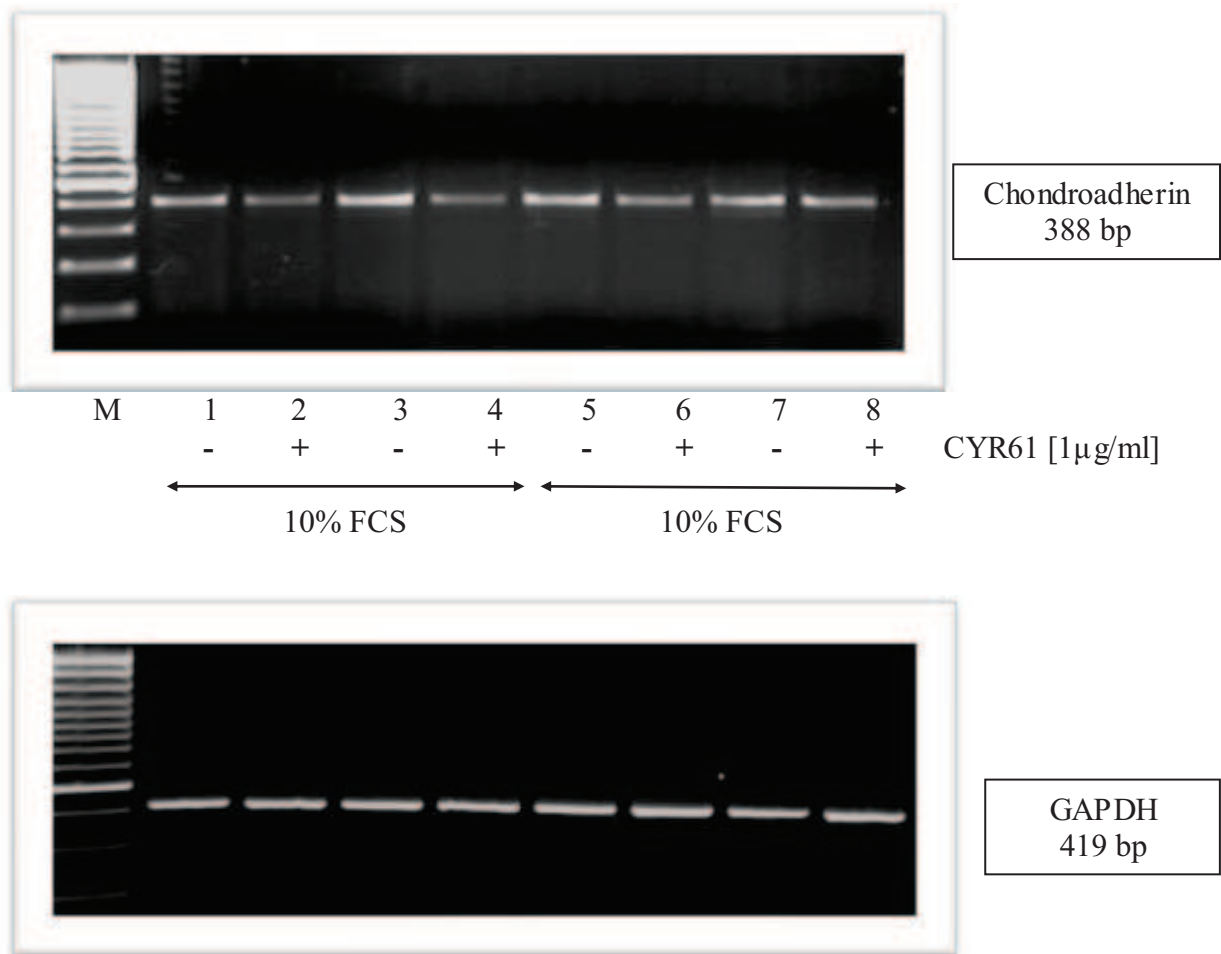
### **3.3.7.2 Versuche für die T/C-28a2-Zellen**

Die Experimente für die T/C-28a2-Zellen wurden unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden zweimal wiederholt.

Zu den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>+3</sub> stellte sich in beiden Experimenten eine verminderte Bandenintensität unter CYR61-Behandlung dar.

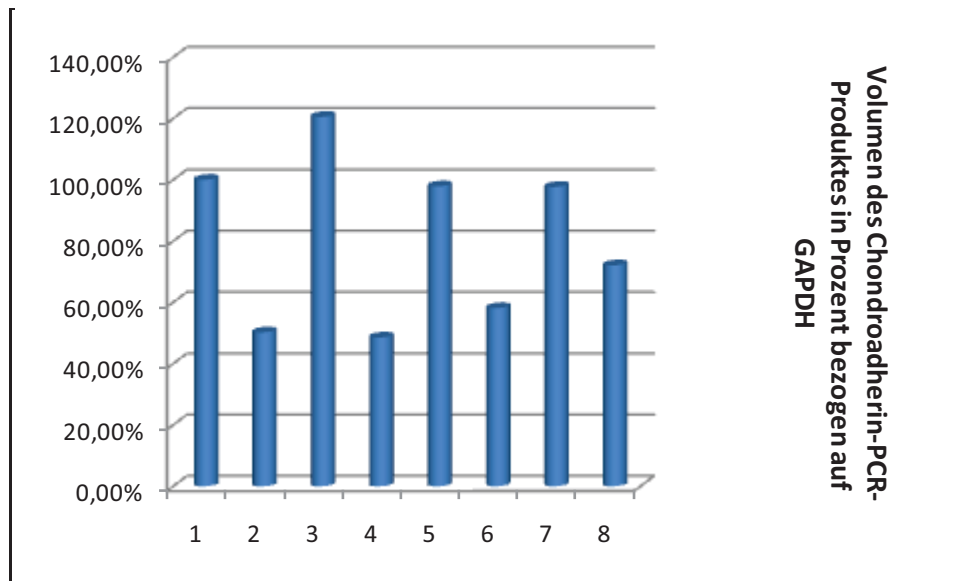
Die folgende Abbildung (Abb. 10a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Chondroadherin. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 10b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

Abb. 10a) Chondroadherin und GAPDH



Legende zu Abb. 10a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Chondroadherin und GAPDH: M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-8 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die T/C-28a2-Zellen wieder. Die Proben 1-4 entsprechen dem ersten Experiment, die Proben 5-8 dem zweiten Experiment. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 10b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 10a



Legende zu Abb. 10b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 10a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 10a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.8 Decorin**

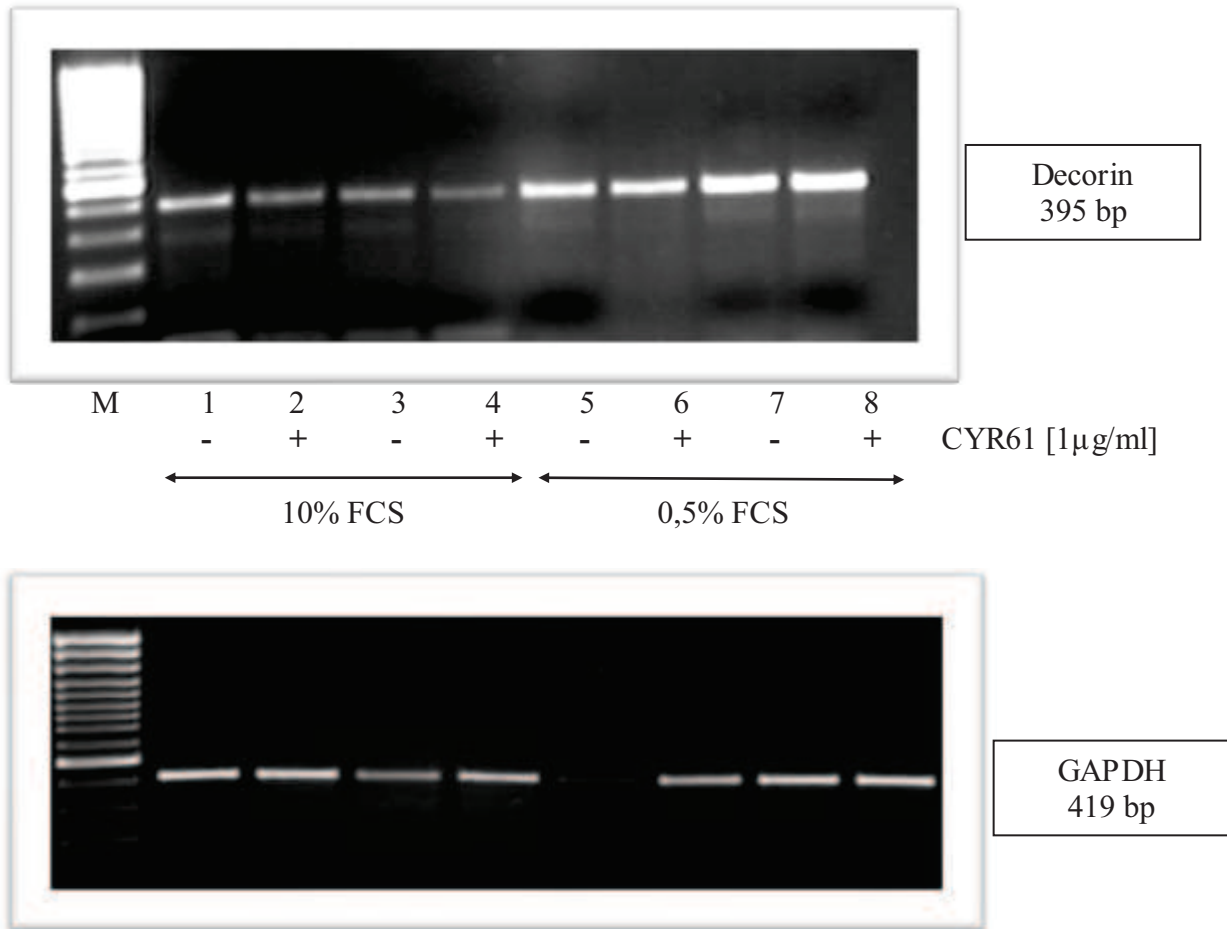
#### **3.3.8.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Ein reproduzierbarer Effekt hinsichtlich der Bandenintensität der RT-PCR-Produkte für Decorin konnte in den unterschiedlichen Experimenten nicht dargestellt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 11a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Decorin. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 11b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

Abb. 11a) Decorin und GAPDH

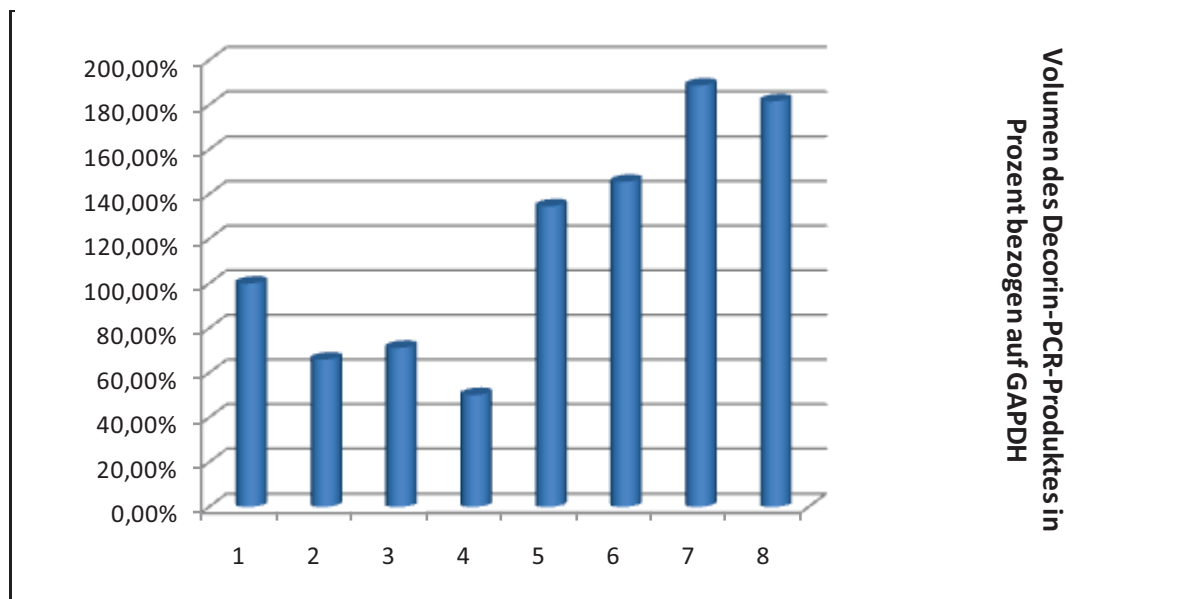


Legende zu Abb. 11a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Decorin und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) und die Proben 5-8 unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/12-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).



Abb. 11b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb.11a



Legende zu Abb. 11b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 11a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 11a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### 3.3.9 Fibromodulin

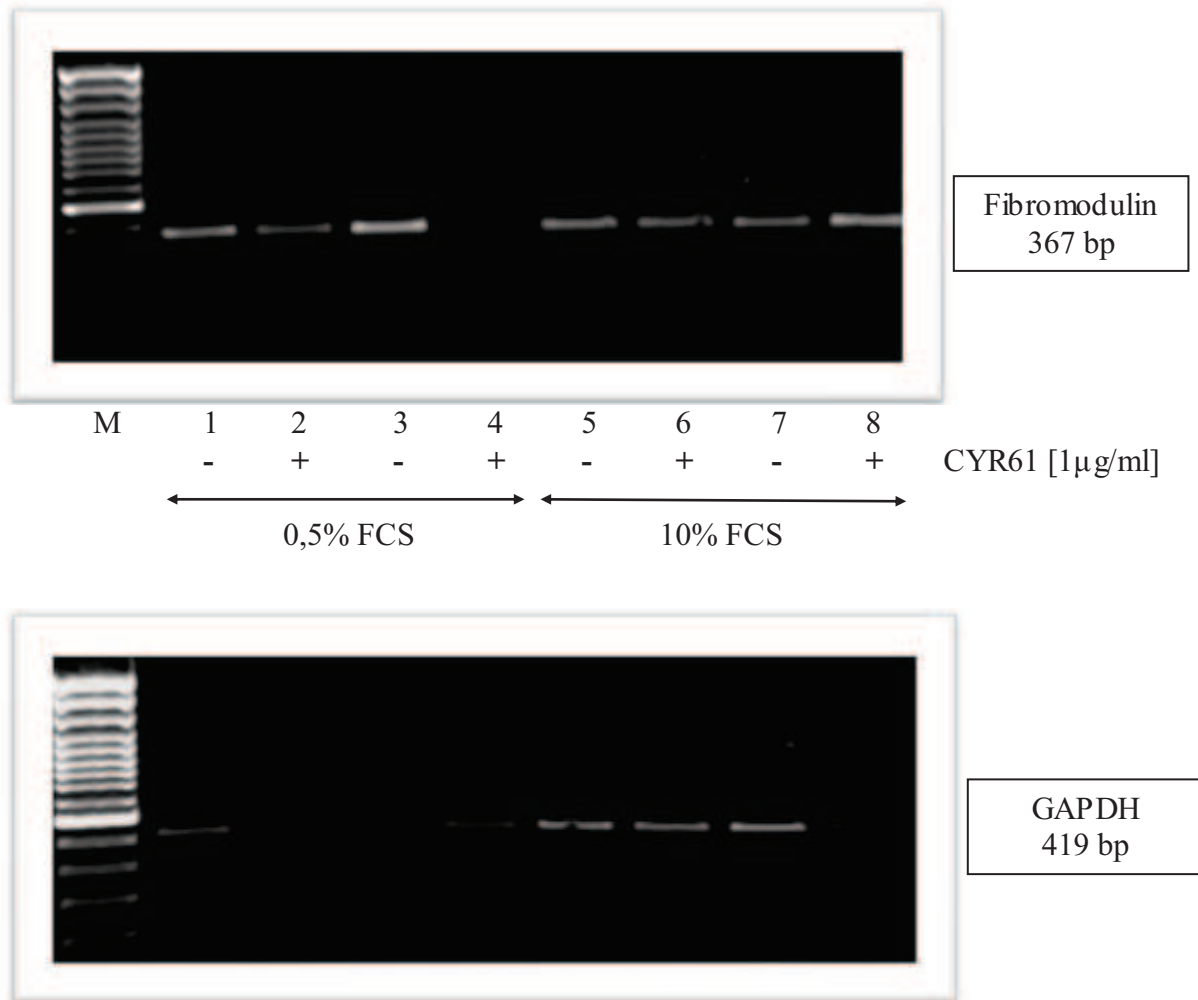
#### 3.3.9.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen

Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zeigte sich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> eine verminderte Bandenintensität in den CYR61- behandelten Zellen und zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> eine vermehrte Intensität der Banden in den mit CYR61 behandelten Zellen. Diese Effekte konnten in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen konnte die verminderte Bandenintensität in den CYR61- behandelten Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> in zwei Experimenten dargelegt werden. Im Vergleich der Bandenintensitäten unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen wurde in den nicht mit CYR61 behandelten Zellen eine verminderte Bandenstärke zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> im Gegensatz zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> gesehen. Eine vermehrte Intensität der Banden zeigte sich zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> im Vergleich zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> in den mit CYR61 behandelten Zellen. Diese Effekte unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen konnten in zwei Experimenten bestätigt werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 12a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Fibromodulin. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 12b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

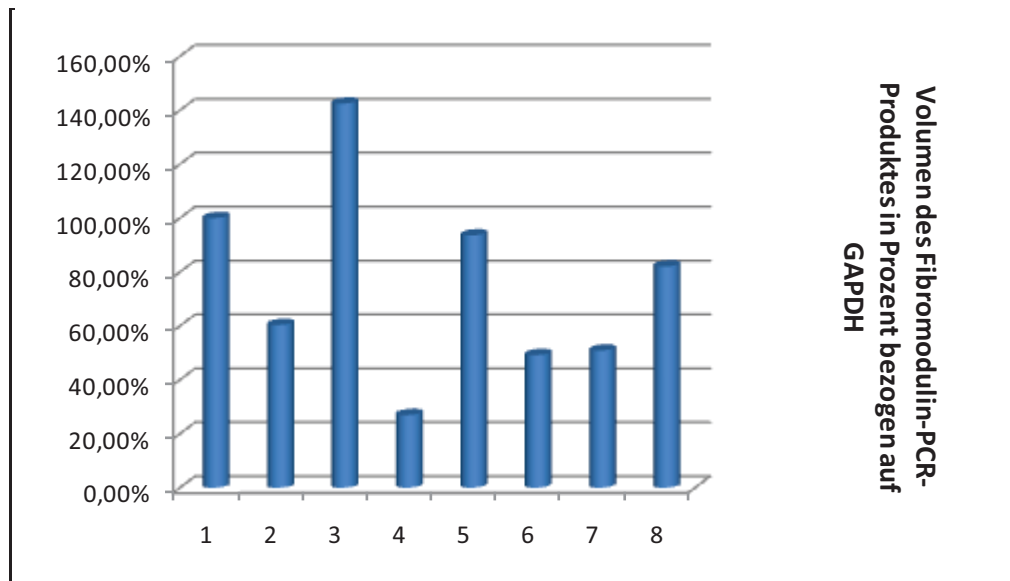
Abb. 12a) Fibromodulin und GAPDH



Legende zu Abb. 12a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Fibromodulin und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 12b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 12a



Legende zu Abb. 12b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 12a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 12a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

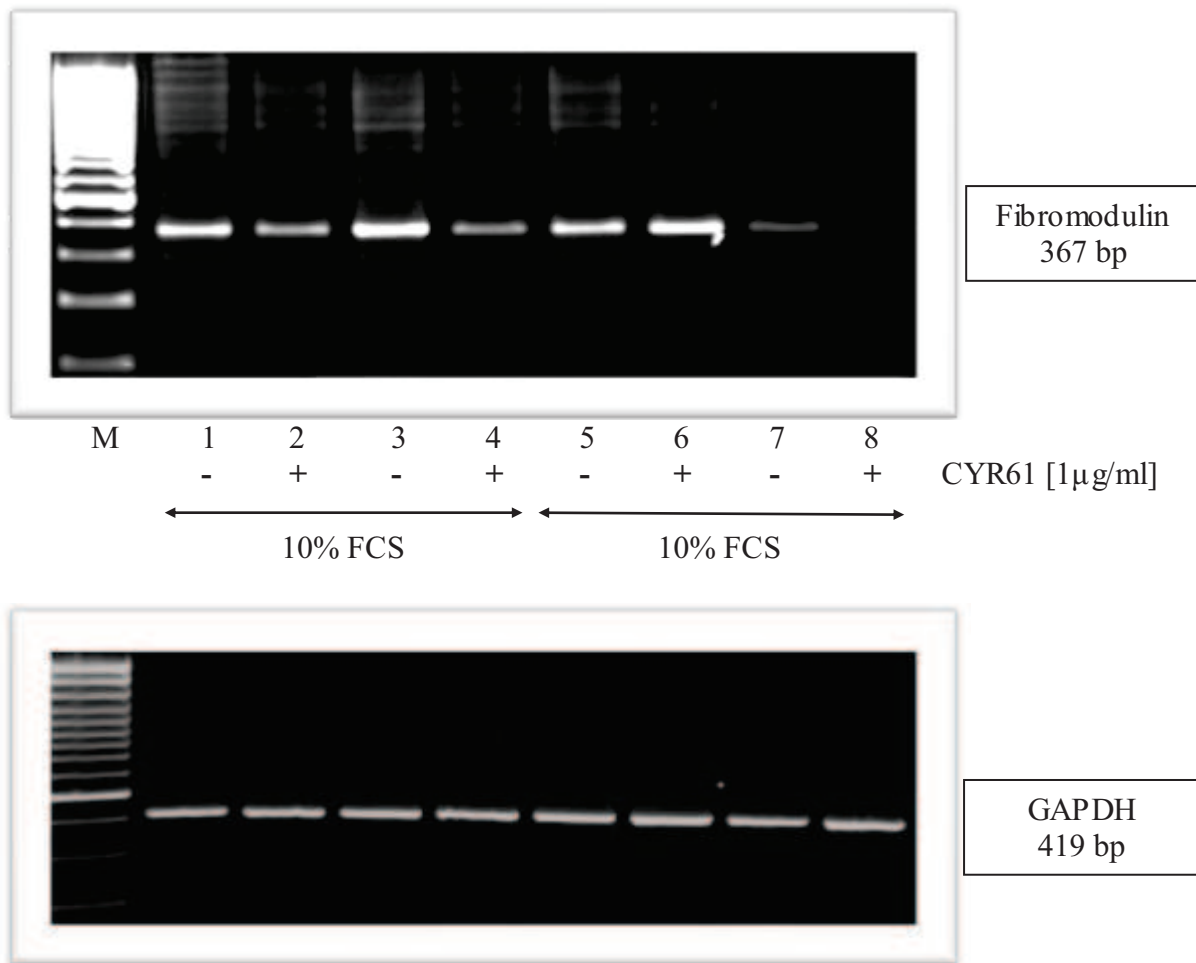
### **3.3.9.2 Versuche für die T/C-28a2-Zellen**

Die Experimente für die T/C-28a2-Zellen wurden unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden zweimal wiederholt.

Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen wurde zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> eine Abnahme der Bandenintensität für die mit CYR61- behandelten Zellen in beiden Experimenten beobachtet. Zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> zeigte sich im ersten Versuch eine verminderte und im zweiten Versuch eine vermehrte Bandenintensität in den mit CYR61- behandelten Zellen.

Die folgende Abbildung (Abb. 13a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Fibromodulin. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 13b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

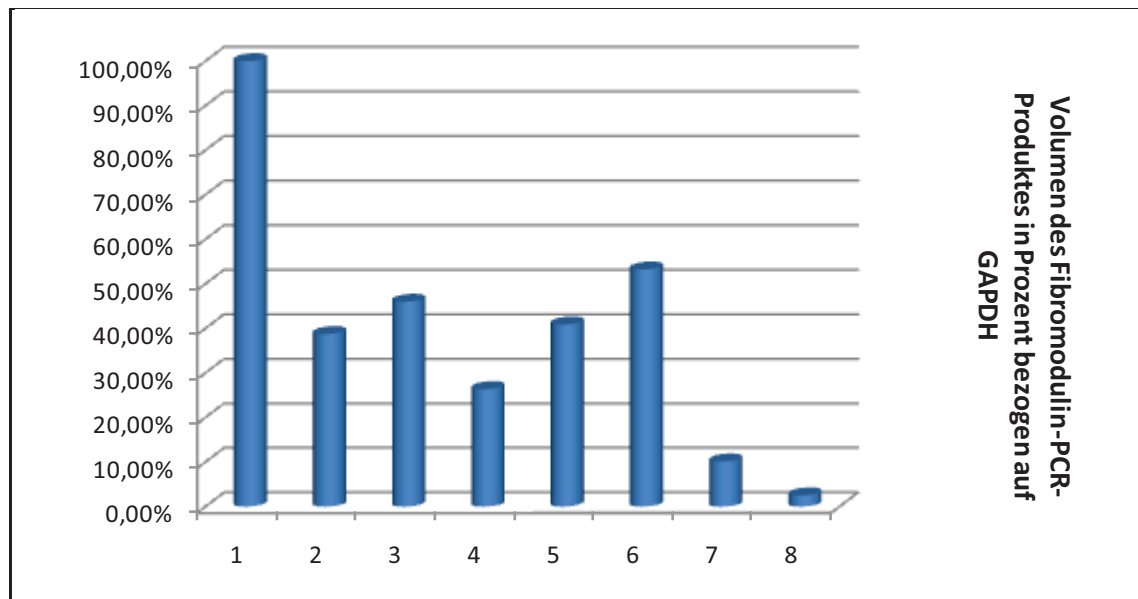
Abb. 13a) Fibromodulin und GAPDH



Legende zu Abb. 13a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Fibromodulin und GAPDH:

M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-8 geben die Ergebnisse unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die T/C-28a2-Zellen wieder. Die Proben 1-4 entsprechen dem ersten Experiment, die Proben 5-8 dem zweiten Experiment. Die Zellen zum Zeitpunkt T0 sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T0) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 13b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 13a



Legende zu Abb. 13b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 13a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 13a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

### **3.3.10 Versican**

#### **3.3.10.1 Versuche für die C-28/I2-Zellen**

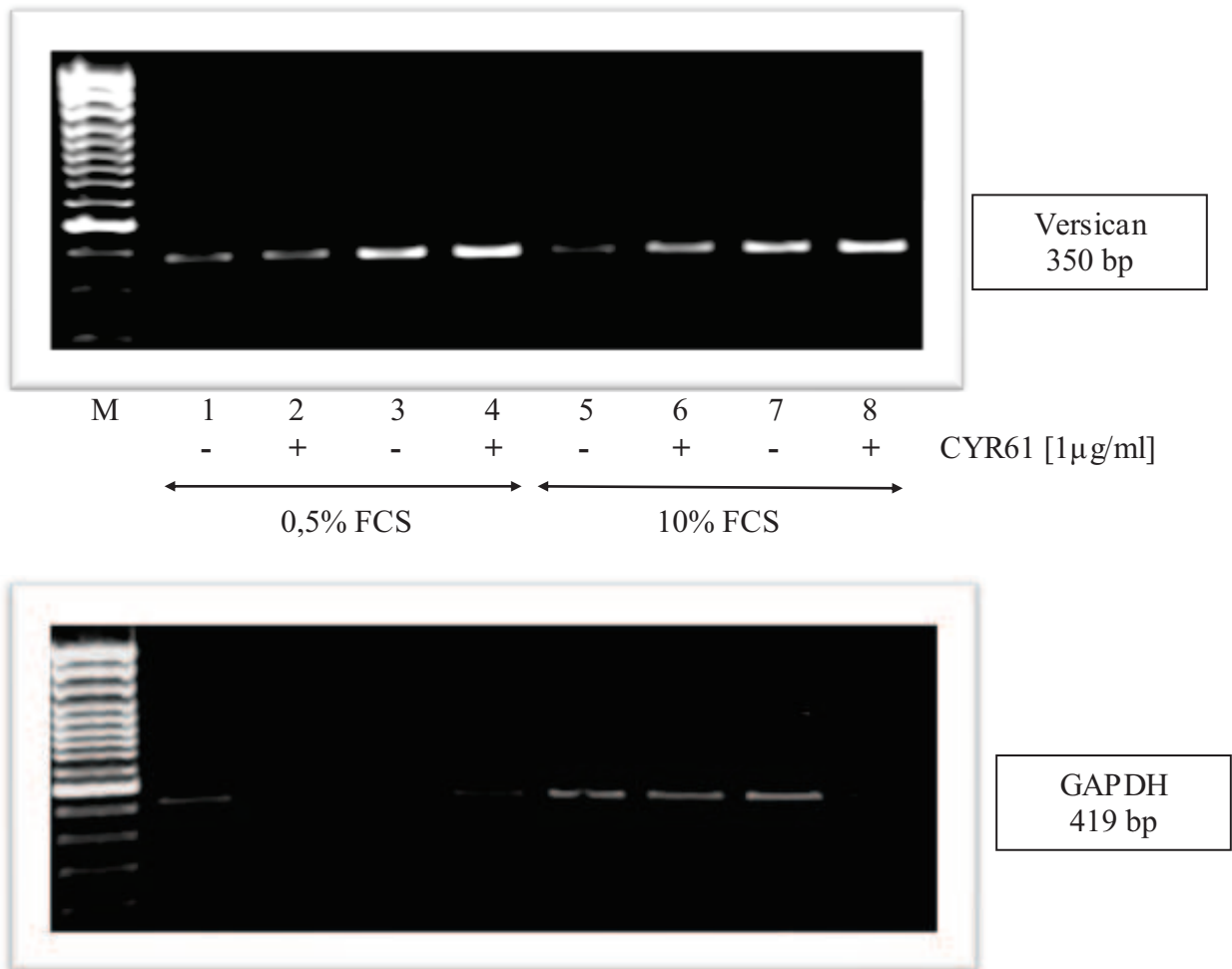
Die Experimente für die C-28/I2-Zellen wurden unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Jeweils dreimal wurden die Versuche wiederholt. Das dritte Experiment erfolgte ausschließlich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen.

In den Experimenten für Versican konnten keine Ergebnisse reproduziert werden. Im dargestellten Experiment zeigte sich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt T<sub>+3</sub> eine vermehrte Bandenintensität unter CYR61-Behandlung und auch zu den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>+3</sub> unter serumhaltigen Zellkulturbedingungen.

Die folgende Abbildung (Abb. 14a) demonstriert die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte exemplarisch für Versican. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 14b) ist die densitometrische Auswertung graphisch dargestellt.

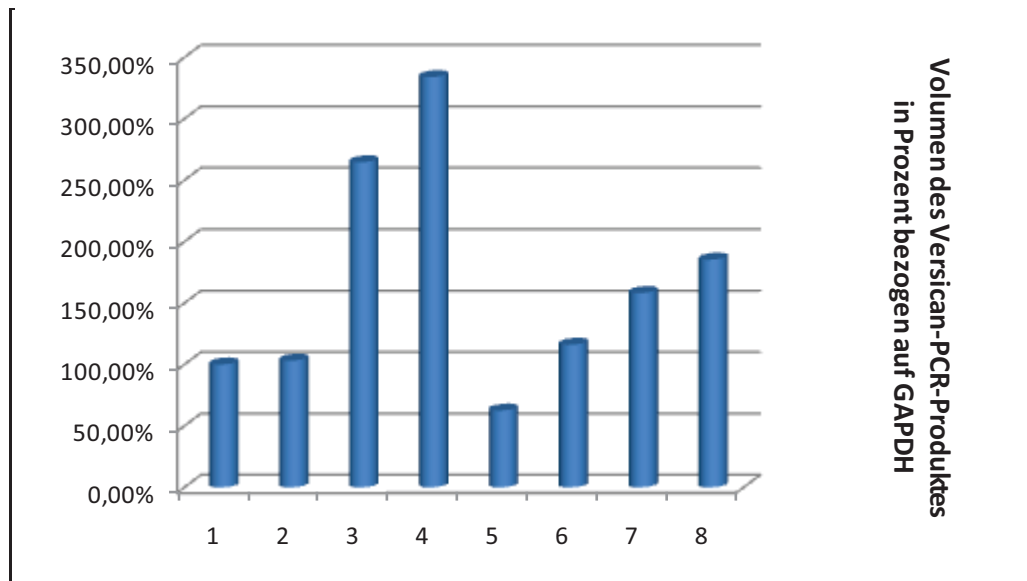


Abb. 14a) Versican und GAPDH



Legende zu Abb. 14a) Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte für Versican und GAPDH: M=100 bp Leiter Standard. Die Proben 1-4 geben die Ergebnisse unter serumreduzierten (0,5% FCS) und die Proben 5-8 unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen für die C-28/I2-Zellen wieder. Die Zellen zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> sind als 1 und 2, sowie 5 und 6 bezeichnet. Die Zellen zum Zeitpunkt T+3 sind als 3 und 4, sowie 7 und 8 bezeichnet. Mediumwechsel und Behandlung (+) mit CYR61 in einer Konzentration von [1µg/ml] erfolgte zweitägig bis zur Konfluenz (T<sub>0</sub>) der Zellen bzw. bis zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage (T+3). Behandelt wurde jeweils eine Probe (2, 4, 6 und 8) und eine Probe diente als Kontrollgruppe (1, 3, 5 und 7).

Abb. 14b) Graphische Darstellung der Densitometrie für Abb. 14a



Legende zu Abb. 14b) Normierte Prozentwerte der PCR-Produkte aus Abb. 14a.

Die optische Dichte der PCR-Produkte aus Abb. 14a wurde am LTF-Rechner mit dem Programm Bio 1D bestimmt. Quantifiziert wurde das Volumen der einzelnen PCR-Produkte (1 bis 8) und anschließend erfolgte die Normierung auf die Werte der GAPDH PCR-Produkte. Die Intensität der Probe 1 wurde = 100% gesetzt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Ziel der Arbeit**

Die Makromoleküle der EZM kann man im Wesentlichen in die Gruppe der Kollagene, sowie der Proteoglykane einteilen. CYR61 besitzt als Mitglied der Familie der CCN Proteine eine Reihe biologischer Funktionen. Erste Hinweise über den Einfluss von CYR61 auf den Knorpelstoffwechsel lieferte die Expression von CYR61 in Mäuseembryonen und Folgearbeiten (O'Brien und Lau, 1992, Wong et al., 1997). Welche Wirkung CYR61 auf die Chondrogenese und damit auch auf das Expressionsverhalten der Makromoleküle der EZM hat wurde Gegenstand dieser Arbeit. Die chondrogene Differenzierung unter dem Einfluss von CYR61 wurde anhand zweier Chondrozytenzelllinien untersucht

### **4.2 Funktionsfähigkeit des rekombinanten Proteins**

CYR61 vermittelt eine Reihe zellulärer Funktionen. Zu diesen gehören die Proliferation, die Migration, die Adhäsion und die Differenzierung von Zellen. Weitere biologische Vorgänge die die Familie der CCN Proteine reguliert sind die Angiogenese, Chondrogenese, Wundheilung und Tumorwachstum (Lau und Lam, 1999). Schütze und Mitarbeiter (1998) haben die Expression von CYR61 in humanen Osteoblasten und die Regulation dieses Proteins durch Wachstumsfaktoren, welche für den Knochenstoffwechsel bedeutsam sind nachgewiesen.

Rekombinantes CYR61, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, wird durch eine unserer Arbeitsgruppen hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Expression, Reinigung und auch die Testung der Funktionsfähigkeit von rekombinanten CYR61 erfolgte in Vorarbeiten und wurde auch publiziert (Schütze et al., 2005).

Die CYR61 Wirkung ist dosisabhängig. Eine minimale Konzentration von 0,5 bis 1µg/ml rekombinanten Proteins ist notwendig um CYR61 induzierte Effekte zu erzielen (Kireeva et al., 1996). Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit wurde rekombinantes CYR61 in einer Konzentration von 1µg/ml verwendet.

### 4.3 Endogenes CYR61

Unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle regulieren den Stoffwechsel von Zellen. CYR61 wurde im Mesenchym der Extremitätenanlagen von Mäusen *in vivo* und *in vitro* während der chondrogenen Differenzierung nachgewiesen. Es fördert die Mesenchymzellverdichtungen, steigert die Expression von Kollagen Typ II und die Proteinbiosynthese von knorpelspezifischer Matrix (Wong et al., 1997). Eine endogene Expression von CYR61 im Rahmen der Versuche in dieser Arbeit kann nicht ausgeschlossen werden. Rekombinantes CYR61 wurde in einer bestimmten definierten Konzentration den Zellkulturmedien hinzugegeben. Daher wurden auch Experimente unter serumreduzierten Zellkulturbedingungen (0,5% FCS) durchgeführt um den Einfluss seruminduzierter Effekte zu minimieren. Die Zielsetzung der Experimente war es semiquantitative Unterschiede im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrollgruppe herauszuarbeiten.

### 4.4 Chondrogene Differenzierung in unterschiedlichen Zellkulturen

Es werden Zellkulturen unterschiedlicher Herkunftsgewebe verwendet um Stoffwechselfvorgänge *in vitro* zu untersuchen. In der Vielzahl der Fälle stehen immortalisierte Zelllinien zur Verfügung. In ihrem biologischen Verhalten können sich diese von gesunden Zellen unterscheiden; beispielsweise hinsichtlich der Genexpression und der Signalverarbeitung intra- und interzellulär. Eine Übertragung der Ergebnisse mit immortalisierten Zelllinien *in vitro* auf *in vivo* Verhältnisse ist dennoch möglich, weil sie besser geeignet sind als transformierte Zelllinien.

In der zugrunde liegenden Arbeit wurden zwei immortalisierte humane Chondrozytenzelllinien verwendet welche aus juvenilem Rippenknorpel gewonnen wurden und sich durch eine Neomycinresistenz auszeichnen; C-28/I2 und T/C-28a2. Die Zelllinie der C-28/I2 Zellen leitet sich von der der T/C-28a2 Zellen ab. Beide Zelllinien haben ähnliche Charakteristika. Sie sind nicht tumorigen Ursprungs und proliferieren kontinuierlich unter Monolayer-Zellkulturbedingungen. Weiterhin wurden diese Zellen vielfach in anderen Experimenten dazu verwendet chondrozytenspezifische Merkmale zu untersuchen; beispielsweise die Interleukin-1 $\beta$  vermittelten Stimulationseffekte auf die Genexpression dieser Zellen (Goldring et al., 1994). Die Expression von Sox9, einem der bedeutsamen Gene für die Chondrozytendifferenzierung, wurde für diese Zellen nachgewiesen. Somit ist ein wichtiges phänotypisches Merkmal von Chondrozyten dokumentiert worden. Die in dieser

Arbeit verwendeten Zelllinien, C-28/I2 und T/C-28a2, sind bekannt für ihre proliferative Kapazität, was wiederum negativ mit der Produktion von EZM einhergeht. Jedoch ist die Proliferation der untersuchten Zellsysteme eine Voraussetzung um Experimente vergleichbar *in vitro* durchzuführen. Finger et al. (2003) haben in ihrer Arbeit die molekulare Phänotypisierung der C-28/I2 und T/C-28a2 Zellen vorgenommen und diese Zellen als geeignete Systeme zur Untersuchung chondrozyteneigener Merkmale identifiziert.

#### **4.5 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Detektion der Genexpression steht die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion als sensitivste Methode zur Verfügung (Rappolee et al., 1988).

Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare liegen auf verschiedenen Exons des Gens und wurden somit Intron-Überspannend gewählt. Eine Kontamination mit genomischer DNA und deren PCR Produkte wären wegen der mitamplifizierten Introns deutlich größer ausgefallen (Newton und Graham, 1997). Die mittels RT-PCR amplifizierte DNA hatte in allen Versuchen die erwartete Größe.

Als interner Standard und als positive Expressionskontrolle wurde GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, in allen Experimenten mitamplifiziert. Nach bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen unterliegt dieses Enzym keiner transkriptionellen Regulierung. Aus diesem Grund wird die Expression von GAPDH auch bei verändertem Aktivitätszustand der Zellen kaum beeinflusst. Als *housekeeping* Gen eignet sich GAPDH als interne Kontrolle. Die Amplifikation der mRNA für GAPDH gelang in allen Experimenten gleichermaßen.

#### **4.6 Bewertung der Ergebnisse**

##### **4.6.1 Vergleich der Ergebnisse zwischen serumreduzierten und serumhaltigen Zellkulturbedingungen für die C-28/I2 Zellen**

###### **4.6.1.1 Kollagene Typ I, II, III und XI**

Kollagen Typ I bildet die Fibrillen des lockeren und straffen Bindegewebes und des Knochens. Hyaliner Knorpel enthält physiologischer weise kein Kollagen Typ I. Zellen mesenchymalen Ursprungs wie zum Beispiel Fibroblasten oder Osteoblasten bilden dieses Kollagen. Charakteristischerweise kommt es zusammen mit Kollagen Typ III vor und gehört

ebenso wie Kollagen Typ I zu den fibrillären Kollagenen und spielt eine Rolle bei der Fibrillogenese (Bruckner und van der Rest, 1994; Farjanel et al., 2001).

Kollagen Typ II und XI gehören zu den knorpelspezifischen Proteinen. Strukturell setzt sich Kollagen Typ II aus drei gleichen  $\alpha_1$ -Typ II-Ketten zusammen und ist gekennzeichnet durch ein reichliches Vorkommen von Hydroxylysin, welches imstande ist ein Netzwerk auszubilden, indem es Tropokollagenmoleküle sowie Disaccharide zu verbinden vermag. Dadurch bildet es das Grundgerüst der knorpeligen EZM (Goldring, 2000; Bruckner und van der Rest 1994).

Proliferierende Chondrozyten exprimieren Kollagen Typ I mRNA in reziproker Weise zu Kollagen Typ II mRNA (Kokenyesi et al., 2000). Eine vermehrte Kollagen Typ I-Biosynthese spiegelt den Verlust des Phänotyps der Chondrozyten wieder. Die Experimente zeigen für die postkonfluente Phase (Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage) eine Zunahme der mRNA Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zum Zeitpunkt der Konfluenz. Diese Expression fällt unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen deutlicher aus, was für einen seruminduzierenden Effekt spricht. Vergleichbare Ergebnisse konnten für Kollagen Typ III, welches zusammen mit Kollagen Typ I vorkommt, dargestellt werden. Auch hier konnte eine Zunahme des PCR Produktes für Kollagen Typ III für die Zellen zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage nachgewiesen werden.

Die Expression von Kollagen Typ II zeigt ein reziprokes Verhalten zu dem von Kollagen Typ I und III. Hier konnte jeweils unter serumhaltigen (10% FCS) und serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen eine Herunterregulation von Kollagen Typ II zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage demonstriert werden. Dieser Effekt ist ausgeprägter unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen. Diese Tatsache könnte sich darin widerspiegeln, dass eine Dedifferenzierung der Zellen unter serumhaltigen (10% FCS) Versuchsbedingungen gefördert wird, wohingegen serumreduzierte (0,5% FCS) Zellkulturmedien die Chondrozyten in einem Stadium höherer Differenzierung halten. Untermauert wird dieser Befund durch das Expressionsverhalten von Kollagen Typ I. Zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage zeigt sich Kollagen Typ I höherreguliert im serumhaltigen (10% FCS) Experiment. Kokenyesi et al. (2000) haben in ihren Arbeiten bereits gezeigt, dass serumhaltige Zellkulturmedien einen proliferativen Effekt auf die Chondrozyten Zelllinie T/C-28a2 haben und phänotypische Merkmale zunehmend exprimiert werden, wenn die Zellproliferation abnimmt.

Kollagen Typ XI ist strukturell ein heterotrimer aus je einer  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ -Typ XI-Kette und kommt zusammen mit Kollagen Typ II im Knorpel vor. Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zeigt es ein gleichsinniges Expressionsverhalten wie

Kollagen Typ II. Es kommt zu einer Herunterregulation von Kollagen Typ XI zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage.

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten zeigen die C-28/I2 Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz einen höheren Grad der Differenzierung als zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage. Das reziproke Expressionsverhalten insbesondere von Kollagen Typ I und II wird in der Literatur ebenso aufgeführt (Kokenyesi et al., 2000), wie eine verminderte Expression von Kollagen Typ II ein Kriterium für den zunehmenden Verlust der Chondrozytendifferenzierung ist (Goldring et al., 1988; Aulthouse and Beck, 1989). Das Expressionsverhalten von Kollagen Typ II und XI in der Monolayerkultur nach Erreichen des Konfluenzstadiums kann durch eine Differenzierung der zuvor proliferierenden Chondrozyten erklärt werden. Zum Zeitpunkt der Konfluenz sind Bedingungen an das Zellsystem bereits zum Teil erfüllt, welche eine Rolle bei Differenzierungsprozessen spielen (Finger et al., 2003; Buchwalter und Mankin, 1997); zum Beispiel die Herstellung von Zell-Zell-Kontakten. Eine Entdifferenzierung der Chondrozyten während der Proliferation vor Erreichen der Konfluenz und eine beginnende Redifferenzierung nach Erreichen der Konfluenz ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Chacko et al., 1969).

#### **4.6.1.2 Proteoglykane**

Proteoglykane sind eine heterogene Gruppe von Proteinen die strukturell und funktionell unterschiedlichen Familien angehören. Im Rahmen zellulärer Vorgänge kann ihre Struktur diversen Modulationen unterliegen. Das betrifft vor allen Dingen die Länge und Anzahl der kovalent gebundenen Glykosaminoglykanketten, sowie den Grad ihrer Sulfatierung. Entsprechend erfüllen sie verschiedene biologische Funktionen in der Organisation der perizellulären und extrazellulären Matrix. Im hyalinen Knorpel kann man im Wesentlichen zwei große Gruppen von Proteoglykanen unterscheiden: einerseits Aggrecan, ein hochmolekulares Proteoglykanmonomer, das dazu neigt Aggregate zu bilden, andererseits die kleinen leucinreichen Proteoglykane wie Biglycan, Decorin oder Fibromodulin. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Proteoglykane wie Versican oder Chondroadherin. Wegen ihrer hohen Zahl negativer Ladungen besitzen sie ein ausgeprägtes Wasserbindungsvermögen und sind somit verantwortlich für die hohe Druckelastizität des Knorpels (Hardingham und Fosang, 1992; Vertel, 1995; Kokenyesi, 2000).

Aggrecan ist wie Kollagen Typ II ein knorpelspezifischer Marker und wird durch differenzierte Chondrozyten exprimiert. Die Ergebnisse für Aggrecan legen ein beinahe

identisches Verhalten zu denen von Kollagen Typ II dar. Die Zellen zeigen zum Zeitpunkt der Konfluenz mehr PCR Produkt als zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage. Dieser Effekt fällt wie für Kollagen Typ II unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen deutlicher aus. Diese Tatsache spricht für einen negativen Einfluss von serumhaltigem Zellmedium für die Differenzierung der Zellen. Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Bedingungen wird ein höherer Differenzierungsgrad der Zellen beibehalten.

Biglycan und Decorin zeigen einen ähnlichen Strukturaufbau und binden ein oder zwei Chondroitin- bzw. Dermatanulfatketten, wohingegen Fibromodulin durch Bindung von Keratansulfatketten gekennzeichnet ist. Decorin und Fibromodulin kommt eine Bedeutung in der Organisation der EZM zu, indem sie Kollagen Typ I und II binden. Biglycan bindet kein Kollagen und seine genaue Bedeutung ist bislang ungeklärt (Hardingham und Fosang, 1992; Vertel, 1995; Kokenyesi, 2000).

Biglycan, ein Proteoglykan welches im reifen Knorpel nachweisbar ist, zeigt unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen eine Expressionsabnahme zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage. Damit liegt ein gleichsinniges Ergebnis wie für die knorpelspezifischen Marker Kollagen Typ II und Aggrecan vor.

Ein reproduzierbarer Effekt für Decorin in den unterschiedlichen Experimenten konnte nicht gezeigt werden. Die gelelektrophoretische Darstellung des PCR-Produktes für Decorin in Abb. 11a) zeigt für die serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen eine leichte Abnahme des PCR-Produktes zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage. Somit scheint Decorin in der Tendenz den bisher dargestellten Ergebnissen zu folgen und durch proliferierende Zellen herunter reguliert zu werden.

Die Ergebnisse die für Fibromodulin mit den C-28/I2 Zellen erzielt wurden, können nicht hinsichtlich Unterschiede zwischen serumhaltigen (10% FCS) und serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen eingeteilt werden. Jedoch zeigt sich zum Zeitpunkt der Konfluenz für beide Zellkulturexperimente eine ähnliche Expressionsmenge von Fibromodulin.

Chondroadherin ist ebenfalls der Gruppe der leucinreichen Proteoglykane zuzuordnen und wurde in der Territorialregion von Gelenkknorpel nachgewiesen. Die genauen Funktionen sind nicht bekannt. Mittels des  $\alpha_2 \beta_1$ -Integrinrezeptors stellt es Zell-Zell-Verbindungen her und bindet sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* an Kollagen Typ II (Mansson et al., 2001). Insbesondere unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zeigt sich auch hier eine Herunterregulation zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage.



Versican rechnet man wie Aggrecan zu den großen aggregatbildenden Proteoglykanen. Im Gegensatz zu Aggrecan ist das Vorkommen von Versican jedoch nicht auf das Knorpelgewebe beschränkt. Es kann in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in der Haut, im Hirngewebe oder auch in der Aorta. So ist es voraussichtlich an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt. Speziell im Knorpel ist es zusammen mit Aggrecan für die wasserbindenden Aufgaben verantwortlich (Bode-Lesniewska et al., 1996). Unter serumhaltigen (10% FCS) und serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen konnte zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage vermehrt PCR Produkt für Versican dargestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit nicht veröffentlichten jedoch in der im Jahre 2000 publizierten Arbeit von Kokenyesi und Mitarbeitern erwähnten Aussage, dass mit dem Auftreten von Versican und Kollagen Typ I eine Herunterregulation der knorpelspezifischen Marker Aggrecan und Kollagen Typ II stattfindet.

Es treffen im Wesentlichen dieselben Schlussfolgerungen für die Proteoglykane zu, wie sie bereits für die Kollagene aufgeführt wurden. Insbesondere muss man an dieser Stelle das Proteoglykan Aggrecan hervorheben. Neben Kollagen Typ II zählt man Aggrecan zu den knorpelspezifischen Markern. Beide zeigen ein gleichgerichtetes Ergebnis. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums sind die Zellen durch einen höheren Grad der Differenzierung gekennzeichnet als sie dies zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage sind. Das spiegelt sich durch eine vermehrte Expression der entsprechenden Gene zum Konfluenzzeitpunkt wieder. Verstärkt wird dieser Effekt durch proliferationsverlangsamende Zellmedien, wie die Experimente unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen eröffnen.

Die Ergebnisse für Biglycan und Chondroadherin und in geringerem Maße auch Decorin stützen die bisherigen Aussagen. Versican wiederum scheint mit einer Dedifferenzierung der Chondrozyten einherzugehen.

#### **4.6.2 Vergleich der Ergebnisse zwischen den C-28/I2 und T/C-28a2 Zellen**

Finger und Mitarbeiter (2003) haben in ihrer Arbeit die molekulare Phänotypisierung der C-28/I2 und T/C-28a2 Zellen vorgenommen. Beide Zelllinien exprimieren Sox9, ein für die Chondrozyten charakteristisches phänotypisches Merkmal. Weiterhin sind diese Zellen durch eine vornehmlich proliferative Tendenz gekennzeichnet. Insbesondere die C-28/I2 Zellen spiegeln jedoch ein höheres Ausmaß an einer Expression von matrixanabolen und –katabolen Genen wieder.

Serumhaltige (10% FCS) Zellmedien fördern die Proliferation der T/C-28a2 Zellen, welche unter Monolayerbedingungen kultiviert werden. Diese Tatsache wiederum führt zu einem deutlich besseren Zellüberleben und auch zu einer höheren Ausbeute an Proteoglykanen (Kokenyesi, 2000).

Die Expression von Kollagen Typ III zeigt nicht nur für die C-28/I2 Zellen, sondern auch für die T/C-28a2 Zellen ein gleichsinniges Ergebnis. Zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage ist vermehrt PCR Produkt nachweisbar.

Die Chondroadherinexpression für die T/C-28a2 Zellen liefert keine Unterschiede hinsichtlich des Zeitpunktes der Expression. Wohingegen die C-28/I2 Zellen eine Herunterregulation zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage demonstrieren.

Für die T/C-28a2 Zellen konnte zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage jeweils eine Abnahme des PCR Produktes für Fibromodulin beobachtet werden. Im Gegensatz dazu lieferten die C-28/I2 Zellen diesbezüglich keinen Hinweis.

Die Kultivierung der T/C-28a2 Zellen und der Nachweis knorpelspezifischer Marker ist im Vergleich zu den C-28/I2 Zellen deutlich erschwert gewesen. Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturmedien proliferieren die T/C-28a2 Zellen sehr stark und schnell. Aggrecan und Kollagen Typ II sind Marker für den differenzierten Chondrozyten und werden in proliferierenden Chondrozyten kaum exprimiert (Kokenyesi, 2000). In den hier durchgeführten Experimenten für die T/C-28a2 Zellen gelang der Nachweis der Expression für Kollagen Typ III, Fibromodulin und Chondroadhaerin. Die anderen Marker konnten nicht suffizient nachgewiesen werden. Kollagen Typ III zeigt einen Verlust der Chondrozytendifferenzierung an. Dieser Verlust wurde für die proliferierenden T/C-28a2 Zellen nachgewiesen. Untermuert wird dieser Effekt durch eine Abnahme der Fibromodulinexpression der T/C-28a2 Zellen zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage.

#### **4.6.3 CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung**

Mögliche Effekte des CYR61 Proteins auf die chondrogene Differenzierung wurden anhand des unterschiedlichen Expressionsverhaltens diverser Markerproteine (s. Tab 1 und 2) untersucht. Hierbei wurden die Experimente für die C-28/I2 Zellen unter serumreduzierten (0,5% FCS) und serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Experimente für die T/C-28a2 Zellen fanden unter serumhaltigen Zellkulturbedingungen statt.

#### **4.6.3.1 CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung der C-28/I2 Zellen**

Nach Erreichen der Konfluenz wurde für Kollagen Typ I unter der Wirkung von CYR61 jeweils eine leichte Abnahme der Expression gesehen und zum Konfluenzzeitpunkt + 3 Tage jeweils eine leichte Zunahme der Expression. Diese Effekte trafen sowohl unter serumreduzierten (0,5% FCS) als auch unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zu. Die CYR61 vermittelten Wirkungen in der serumreduzierten (0,5% FCS) Versuchsreihe sind diskret stärker ausgeprägt. Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz befinden sich in einem Stadium der höheren Differenzierung. Die Stimulation mit CYR61 führt hier zu einer leichten Abnahme der Kollagen Typ I Expression, einem Marker der Chondrozytenendifferenzierung. Inwieweit dieses Ergebnis auf eine CYR61 Wirkung hinsichtlich einer chondrogenen Differenzierung gedeutet werden kann ist an dieser Stelle abschließend nicht sicher möglich.

Für Kollagen Typ II gilt, dass CYR61 zu einem Herunterregulieren der Expression geführt hat. Insbesondere trifft diese Tatsache für das Erreichen des Konfluenzzeitpunktes unter serumreduzierten (0,5% FCS) als auch unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zu. Diese Wirkung lässt sich auch zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage für die serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingung darstellen. Eindrücklich kommt die CYR61 vermittelte Expressionsabnahme unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingung nach Erreichen der Konfluenz zur Geltung, was in einer mangelnden Seruminduktion der Zellen begründet liegen könnte. Weiterhin proliferierende Zellen exprimieren erwartungsgemäß weniger Kollagen Typ II wie zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage dargestellt (s. Abb. 3b). Jedoch fällt diese Expressionsabnahme in der CYR61 stimulierten Kontrolle zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingung nicht so stark aus und unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen kommt es sogar zu einem leichten Anstieg der Kollagen Typ II Expression. Diese Tatsache könnte daraufhin deuten, dass CYR61 Effekte vor allem Zellen höherer Differenzierungsstufe betreffen.

Die Expression von Kollagen Typ III nahm in der mit CYR61 behandelten Gruppe nach Erreichen des Konfluenzstadiums zu. Dieser Effekt konnte unter serumreduzierten (0,5% FCS) als auch unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen nachgewiesen werden. Eine leichte Zunahme unter dem Einfluss von CYR61 wurde unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen, so wie für Kollagen Typ I, zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage beobachtet. Die CYR61 Effekte sind in der serumhaltigen (10% FCS) Versuchsreihe

weniger stark ausgeprägt. Ursächlich könnte auch hier eine seruminduktive Wirkung auf die Zellen vorliegen. Weiterhin sind die Effekte im Konfluenzstadium, einem Stadium der höheren Zelldifferenzierung, stärker ausgeprägt.

Eine deutliche Herunterregulation für Kollagen Typ XI nach Stimulation mit CYR61 konnte für die Zellen nach Erreichen der Konfluenz und eine leichte Expressionsabnahme unter CYR61 Wirkung zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen dargestellt werden. Jedoch muss man auch an dieser Stelle festhalten, dass die Menge an PCR Produkt in der nicht CYR61 stimulierten Kontrolle unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen mit zunehmender Proliferation abgenommen hat, wohingegen in der mit CYR61 stimulierten Versuchsreihe die Menge an PCR Produkt zugenommen hat. Insofern sind die Ergebnisse für Kollagen Typ II und XI gleichsinnig. In Zusammenschau der Ergebnisse für Kollagen Typ II, III und XI zeigt sich, dass CYR61 insbesondere auf Zellen höherer Differenzierungsstufe einen Effekt hatte.

CYR61 Effekte auf Aggrecan zeigen sich in einem Hochregulieren dieses Markers unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zu beiden Zeitpunkten. Gegenzug zeigt sich unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen. Hier wurde die Aggrecanexpression jeweils zu beiden Zeitpunkten herunter reguliert. Wie für Kollagen Typ II, III und XI ist auch für Aggrecan der Einfluss von CYR61 auf die Zellen höherer Differenzierungsstufe zum Zeitpunkt der Konfluenz stärker ausgeprägt. Die Ursache dafür, dass Aggrecan, ein spezifischer Marker der chondrogenen Differenzierung, unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen unter CYR61 Stimulation herunter reguliert wurde, könnte im Vorhandensein eines serumreichen Zellmediums liegen. Dieses fördert vor allem die Zellproliferation und weniger die Differenzierung der Zellen.

Für Biglycan konnte unter CYR61 Wirkung eine Expressionsabnahme unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zum Konfluenzzeitpunkt und jeweils eine Zunahme der Expression zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage unter serumreduzierten (0,5% FCS) als auch unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen nachgewiesen werden. Wobei die Zunahme unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen stärker ausgeprägt ist.

Für Chondroadherin gilt, dass unter serumreduzierten (0,5% FCS) als auch unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen CYR61 zu einer vermehrten Expression zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage führt. Eine Abnahme der Expression zeigt sich unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen unter CYR61 Wirkung nach Erreichen der Konfluenz.

Einheitliche Ergebnisse für Decorin hinsichtlich einer Wirkung von CYR61 konnten in den verschiedenen Experimenten nicht erzielt werden.

CYR61 Effekte auf die Expression von Fibromodulin äußern sich in einer Herunterregulation unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zu beiden untersuchten Zeitpunkten, sowie unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt der Konfluenz. Vermehrt wurde Fibromodulin unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage exprimiert.

Versican wurde unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen zu beiden untersuchten Zeitpunkten unter CYR61 Wirkung leicht Hochreguliert. Dieser Effekt zeigte sich auch unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass CYR61 reproduzierbare Effekte auf die Expression der unterschiedlichen untersuchten Marker besitzt. Die CYR61 vermittelten Wirkungen treten vorwiegend unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen auf. Hier sind die Effekte stärker ausgeprägt. Dies macht insofern Sinn, da CYR61 das Produkt eines durch Wachstumsfaktoren induzierbaren Frühe-Phase-Gens ist und in serumreduzierten (0,5% FCS) Zellmedien die Konzentrationen an entsprechenden Wachstumsfaktoren, im Vergleich zu den Verhältnissen in serumhaltigen (10% FCS) Zellmedien, in einer geringeren Konzentration vorliegen. Damit sind mögliche seruminduktive Effekte auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen in einer serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkultur minimiert. Exogen zugeführtes CYR61 kann daher als Additiv Effekte, die diesem Protein zu Eigen sind, in den stimulierten Zellen vermitteln.

Ein einheitlicher Effekt unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen zeigt sich zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage für Aggrecan, Biglycan, Chondroadhaerin und Versican. Hier kam es unter CYR61 Stimulation jeweils zu einer vermehrten Expression im Vergleich zur nicht CYR61 stimulierten Kontrollgruppe. Unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen wurde nach CYR61 Stimulation zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage jeweils eine Expressionszunahme von Biglycan, Chondroadhaerin, Fibromodulin und Versican beobachtet. Tendenziell lässt sich für die Proteoglykane feststellen, dass CYR61 Effekte im Sinne einer Expressionszunahme für die Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage zutreffen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Chondrozyten in einem Stadium niedrigerer Differenzierung als sie dies zum Konfluenzzeitpunkt sind. CYR61 scheint zumindest die Bildung von Molekülen der EZM anzuregen, selbst wenn die Zellen sich von ihrem Differenzierungsgrad eher in einem proliferativen Stadium befinden.

#### **4.6.3.2 CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung der T/C-28a2 Zellen und Vergleich der Ergebnisse mit den C-28/I2 Zellen**

Für Kollagen Typ III gilt, dass die Zellen nach Erreichen der Konfluenz unter CYR61 Stimulation weniger stark exprimieren und zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage nach CYR61 Stimulation vermehrt exprimieren. Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu denen die für die C-28/I2 Zellen erzielt wurden. Ursächlich für die T/C-28a2 Zellen könnte gelten, dass die CYR61 Wirkung auf die Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz aufgrund deren Differenzierungsstatus herunter regulierender Art ist und auf proliferierende Zellen einen hochregulierenden Effekt hat.

Die Expression von Chondroadherin nimmt unter Stimulation mit CYR61 jeweils zu beiden untersuchten Zeitpunkten ab. Auch hier ist ein im Vergleich zu den C-28/I2 Zellen ein gegensätzlicher Effekt erzielt worden.

Für Fibromodulin konnte zum Zeitpunkt der Konfluenz + 3 Tage jeweils eine Expressionsabnahme unter CYR61 Stimulation dargestellt werden. Für die C-28/I2 Zellen verhält es sich reziprok. Hier kam es zu einer Expressionszunahme unter CYR61 Stimulation. Eine Expressionsabnahme zeigte sich zum Zeitpunkt der Konfluenz für die C-28/I2 Zellen und in einem Experiment auch für die T/C-28a2 Zellen.

Weitere reproduzierbare Ergebnisse für die anderen untersuchten Marker konnten für die T/C-28a2 Zellen nicht erzielt werden. Zumeist ließ sich kein PCR Produkt nachweisen, obwohl die Funktionsfähigkeit der verwendeten Primer mehrfach für die C-28/I2 Zellen bestätigt werden konnte und auch die interne Kontrolle mit GAPDH für die T/C-28a2 Zellen ein richtiges PCR Produkt zeigte.

Aus welchen Gründen die Ergebnisse für die beiden untersuchten Zelllinien, C-28/I2 Zellen und T/C-28a2 Zellen, unter CYR61 Stimulation nicht einheitlich sind, sondern teilweise sogar gegensätzlich sind kann an dieser Stelle nicht abschließend beantwortet werden. Möglicherweise liegen diese Unterschiede im unterschiedlichen Wachstumsverhalten dieser Zellen begründet. Bereits Finger et al. (2003) empfehlen die C-28/I2 Zellen zu bevorzugen um Experimente mit Chondrozyten vorzunehmen.

## 4.7 Ausblick

In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde jeweils ein zweidimensionales Monolayer-Zellkultursystem von zwei immortalisierten humanen Chondrozytenzelllinien verwendet. Charakteristischer Weise zeigt sich jedoch in der Monolayerkultur eine Dedifferenzierung der Chondrozyten. Sie werden „fibroblastenähnlich“ und zeigen ein spindelförmiges Aussehen. Neben den morphologischen Veränderungen treten auch funktionelle Veränderungen auf, die sich in einem veränderten Expressionsverhalten widerspiegeln. Die Zellen beginnen vermehrt Kollagen Typ I, III und V zu exprimieren, wohingegen *in vivo* Chondrozyten durch die Expression von Kollagen Typ II, IX und XI gekennzeichnet sind.

Eine Weiterentwicklung des zweidimensionalen Zellkultursystems stellt die dreidimensionale Pelletkultur dar. Hier können die Chondrozyten mit der EZM in Interaktion treten und die Verhältnisse *in vivo* besser simulieren. Funktionell und morphologisch kommt es zu einer Redifferenzierung der Zellen in der Pelletkultur (Schaller, 2007, Schulze-Tanzil et al., 2002).

Weitere Experimente mit Pelletkulturen in der Folge sind daher notwendig um zu einer besseren Einschätzung der CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung zu gelangen. Hierzu wäre allerdings ein zelluläres Überexpressionssystem erforderlich, da rekombinantes CYR61 Protein an Matrixproteinen an der Außenseite der Pellets binden würde und somit die Zellen des Pellets insgesamt nicht beeinflussen würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde rekombinantes CYR61 in einer bestimmten vorab definierten Menge dem Zellmedium hinzugefügt um die Chondrozyten zu stimulieren. Eine endogene CYR61 Expression ist nicht auszuschließen. Welchen Anteil endogenes CYR61 an der chondrogenen Differenzierung einnimmt kann mit den bisherigen Ergebnissen nicht abschließend beantwortet werden. Die Knock out Methode z.B. ist als ein lentivirales System zur stabilen Überexpression sogenannter shRNA's nun auch in der Arbeitsgruppe etabliert und ist ein gängiges Verfahren um ein definiertes Gen auszuschalten (Manis, 2007). Auf diese Weise wäre es möglich die endogene CYR61 Expression zu verhindern, um so die Wirkung des exogen zugeführten CYR61 beurteilen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Die Etablierung transplantierbarer Gewebe unterschiedlicher Herkunft ist die Bemühung zahlreicher Arbeitsgruppen. Dies gilt auch für die Kultivierung humaner Chondrozyten. Um ein biologisch hochwertiges Transplantat herstellen zu können ist die Kenntnis über eine mögliche zell- und molekularbiologische Beeinflussung der Chondrozyten von besonderer Bedeutung.

CYR61 ist ein Mitglied der Familie der CCN Proteine, welche sezerniert werden und mit der EZM assoziiert sind. In früheren Arbeiten wurde CYR61 bereits als ein an der Chondrogenese beteiligter Faktor beschrieben. In Anlehnung an diese Erkenntnis entwickelte sich das Interesse den Einfluss von CYR61 auf die chondrogene Differenzierung aufzuzeigen.

Die CYR61 Wirkung auf den Knorpelstoffwechsel wurde hierfür anhand zweier verschiedener Zelllinien (C-28/I2 und T/C-28a2) untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte hierbei in einem zweidimensionalen Monolayermodell. Zur Minimierung möglicher seruminduktiver Effekte auf die chondrogene Differenzierung wurden die Experimente auch unter serumreduzierten Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Veränderungen des zellulären Phänotyps wurden auf der Ebene der Genexpression mittels RT-PCR nachgewiesen. Verschiedene Kollagene und Proteoglykane, welche charakteristisch für Chondrozyten sind, wurden hierzu in ihrem veränderten Expressionsmuster untersucht.

Die Stimulation der Knorpelzellen erfolgte mit rekombinantem CYR61. Das Expressionsmuster der Marker wurde zu zwei definierten Zeitpunkten bestimmt; Zeitpunkt der Konfluenz und Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage.

Die Experimente die dieser Arbeit zugrunde liegen zeigen zunächst, dass das verwendete Nährmedium und auch der Zellzyklus in dem sich die Zellen gerade befinden einen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Chondrozyten haben. Wie bereits in der Literatur beschrieben zeigt die Expression von Kollagen Typ II, einem Marker des differenzierten Chondrozyten, ein reziprokes Verhalten zu dem von Kollagen Typ I und III. Sowohl unter serumhaltigen (10% FCS) als auch unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen konnte eine Herunterregulation von Kollagen Typ II zum Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage demonstriert werden. Dieser Effekt ist ausgeprägter unter serumhaltigen (10% FCS) Zellkulturbedingungen. Hingegen zeigen die Knorpelzellen zum Konfluenzzeitpunkt einen höheren Differenzierungsstatus, was sich in einer höheren Expressionsrate von Kollagen Typ II im Vergleich zum Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage widerspiegelt.



Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zum Konfluenzzeitpunkt Bedingungen an das Zellkultursystem zumindest auch in der Monolayerkultur teilweise erfüllt sind, welche bedeutsam bei Differenzierungsprozessen sind; beispielsweise die Herstellung von Zell-Zell-Kontakten. Serumhaltige Zellkulturmedien haben einen proliferativen Effekt auf die untersuchten Zellen. Phänotypische Merkmale werden jedoch zunehmend exprimiert, wenn die Zellproliferation abnimmt, wie dies unter serumreduzierten Zellkulturbedingungen der Fall ist.

Die Ergebnisse für die Proteoglykane legen dieselben Schlussfolgerungen nahe, wie sie bereits für die Kollagene aufgezeigt wurden. Auch hier spielen das Nährmedium und auch der Zeitpunkt der Untersuchung eine Rolle für den Proliferations- und Differenzierungsstatus der Zellen. Beispielsweise konnte für Aggrecan gezeigt werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz einen höheren Differenzierungsstatus besitzen, was sich in einer vermehrten Expression von Aggrecan darstellen lässt. Unter proliferationsverlangsamenden Zellkulturbedingungen (0,5% FCS) wird dieser Effekt verstärkt. Sinn machen diese Ergebnisse insofern, dass Aggrecan auch zu den Markern des differenzierten Chondrozyten gerechnet wird.

Die Ergebnisse für Biglycan und Chondroadherin und in geringerem Maße auch für Decorin stützen die bisherigen Aussagen. Versican hingegen scheint mit einer Dedifferenzierung der Chondrozyten einherzugehen.

Die bislang demonstrierten Ergebnisse geben die Verhältnisse für die C-28/I2 Zellen wieder. Inhaltlich folgen die Ergebnisse für die T/C-28a2 Zellen dem bisher dargestellten hinsichtlich des Zeitpunktes der Untersuchung. Die Expressionszunahme von Kollagen Typ III zum Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage zeigt einen Verlust der Chondrozytendifferenzierung an. Gestützt wird dieser Sachverhalt durch eine Abnahme der Fibromodulineexpression der T/C-28a2 Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage.

CYR61 besitzt reproduzierbare Effekte auf die Expression der verschiedenen untersuchten Marker. Unter serumreduzierten (0,5% FCS) Zellkulturbedingungen sind die CYR61 Wirkungen, einem Produkt eines durch Wachstumsfaktoren induzierbaren Frühe-Phase-Gens, tendenziell stärker ausgeprägt. In einem serumreduziertem Zellmedium ist das Angebot an entsprechenden Wachstumsfaktoren vermindert. Somit sind seruminduktive Effekte auf Proliferation und Differenzierung der Zellen eingeschränkt. Durch die Stimulation mit CYR61 können die erzielten Ergebnisse daher auf dieses exogen zugeführte Protein bezogen werden.

Inwieweit CYR61 Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der untersuchten Zellsysteme hat kann abschließend nicht sicher beantwortet werden. Insgesamt zeigt sich tendenziell für die Proteoglykane eine Expressionszunahme zum Zeitpunkt der Konfluenz plus 3 Tage. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen weniger differenziert als zum Zeitpunkt der Konfluenz. CYR61 scheint zumindest die Bildung von Molekülen der EZM anzuregen, selbst wenn die Zellen sich von ihrem Differenzierungsgrad eher in einem proliferativen Stadium befinden.

Die gewonnenen Erkenntnisse legen weitere Untersuchungen nahe, um CYR61 Effekte auf die chondrogene Differenzierung zu untermauern. Beispielsweise sollten Experimente in einer dreidimensionalen Pelletkultur erfolgen, so dass das physiologische Umfeld der Knorpelzellen besser imitiert wird. Zur Ausschaltung endogener CYR61 Effekte kann schließlich in weiteren Untersuchungen auch ein Knockout des CYR61-Gens stattfinden.

## 6. Literaturverzeichnis

**Archer C.W.**, Francis- West P.: The chondrocyte. *The Intern. J. of Biochemistry & Cell Biology* (2003) 35, 401- 404

**Aulthouse A.L.**, Beck M.: Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol.* (1989) 25, 659-686

**Babic A.M.**, Kireeva M.L., Kolesnikova T.V., Lau L.F.: CYR61, product of a growth factor-inducible immediate- early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95, 6355- 6360

**Bi W.**, Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrugge B.: Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* (1999) 22, 85- 89

**Bi W.**, Huang W., Whitworth D.J., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrugge B.: Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98, 6698- 6703

**Bode-Lesniewska B.**, Dours-Zimmermann M.T., Odermatt B.F., Briner J., Heitz P.U., Zimmermann D.R.: Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *The J. of Histochem. and Cytochem.*(1996) 44 (4), 303-312

**Bruckner P.**, van der Rest M.: Structure and function of cartilage collagens. *Mikrosc Res Tec* (1994) 28 (5), 378-84

**Buckwalter J.A.**, Mankin H.J.: Articular Cartilage Part II: *The Journal of Bone and Joint Surgery* (1997) 79A, 612-632

**Chacko S.**, Abbott J., Holtzer S., Holtzer H.: The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *J. Exp. Med.* (1969) 130 (2), 417-442

**Chen C.C.**, Chen N., Lau L.F.: The angiogenic factors CYR61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 10443- 10452

**Chen C.C.**, Mo F.-E., Lau L.F.: The angiogenic inducer CYR61 induces a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 47329- 47337

**Chen N.**, Chen C.C., Lau L.F.: Adhesion of human skin fibroblasts to CYR61 is mediated through integrin  $\alpha_6\beta_1$  and cell surface heparan sulphate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 24953- 24961

**de Crombrughe B.**, Lefebvre V., Nakashima K.: Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Current Opinion in Cell Biology* (2001) 13, 721- 727

**Deng C.**, Wynshaw- Boris A., Zhou F., Kuo A., Leder P.: Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* (1996) 84, 911- 921

**Farjanel J.**, Schürmann G., Bruckner P.: Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX, and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, (2001) 9 Suppl A:S55-63.

**Finger F.**, Schörle C., Zien A., Gebhard P., Goldring M.B., Aigner T.: Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4 and C-28/I2. *Arthritis and Rheumatism* (2003) 48 (12), 3395-3403

**Goldring M.B.**: The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* (2000) 43 (9), 1916-1926

**Goldring M.B.**, Birkhead J.F et al.: Interleukin 1 suppresses expression cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* (1988) 82, 2026-2037

**Goldring M.B.**, Birkhead J.F., Suen L.F., Yamin R., Mizuno S., Glowacki J., et al.: Interleukin-1-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* (1994) 94, 2307-16

**Grzeszkiewicz T.M.**, Kirschling D.J., Chen N., Lau L.F.: CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through integrin  $\alpha_v\beta_5$  and enhances mitogenesis through integrin  $\alpha_v\beta_3$  independent of its carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 21943- 21950

**Grzeszkiewicz T.M.**, Lindner V., Chen N., Lam S.C.-T., Lau L.F.: The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR 61, CCN 1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin  $\alpha_6\beta_1$  and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* (2002) 143 (4), 1441- 1450

**Hardingham T.E.**, Fosang A.J.: Proteoglycans: many forms and functions. *FASEB J.* (1992) 6, 861-870

**Herschmann H.R.**: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* (1991) 60, 281- 319

**Iwata T.**, Chen L., Li C., Ovchinnikov D.A., Behringer R.R., Francomano C.A., Deng C.X.: A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9, 1603- 1613

**Jedsadayanmata A.**, Chen C.C., Kireeva M.L., Lau L.F., Lam S.C.-T.: Activation-dependent adhesion of human platelets to CYR61 and Fisp12/ Mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 24321- 24327

**Karsenty G.**, Wagner E.F.: Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell* (2002) Vol. 2, 389- 406

**Kireeva M.L.**, Lam S.C.-T., Lau L.F.: Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product CYR61 is mediated through integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 3090- 3096

**Kireeva M.L.**, Mo F.-E., Yang G.P., Lau L.F.: Cyr61, a product of a growth factor- inducible immediate- early gene, promotes cell proliferation, migration and adhesion. *Mol. and Cell. Biol.* (1996) 16, 1326- 1334

**Kokenyesi R.**, Tan L., Robbins J.R., Goldring M.B.: Proteoglycan production by immortalized human chondrocyte cell lines cultured under conditions that promote expression of the differentiated phenotype. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2000) 382 (2), 000-013

**Lau L.F.**, Lam S.C.-T.: The CNN family of angiogenic regulators: The integrin connection. Minireview. *Experimental Cell Research* (1999) 248, 44- 57

**Lau L.F.**, Nathans D.: Genes induced by serum growth factors. *Molecular aspects of cellular regulation*, Vol. 6. *Hormonal regulation of transcription* (P. Cohen and J.G. Foulkes, Eds.) (1991) pp. 257- 293. Elsevier, Amsterdam

**Lechner A.**, Schütze N., Siggelkow H., Seufert J., Jakob F.: A CYR61/GFP fusion protein localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. *Bone* (2000) 27, 53-60

**Lefebvre V.**, Li P., de Crombrughe B.: A new long form of Sox5 (L- Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* (1998) 17, 5718- 5733

**Li C.**, Chen L., Iwata T., Kitagawa M., Fu X.Y., Deng C.X.: A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol. Genet.* (1999) 8, 35-44

**Liu X.**, Wu H., Byrne M., Krane S., Jaenisch R.: Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1997) 94 (5), 1852-6

**Löffler G.**, Petrides P.E.: Biochemie und Pathobiochemie. Springer Akad. Verl, Berlin, Heidelberg, New York (1998), 734- 743

**Mansson B.**, Wenglén C., Mörgelin M., Saxne T., Heinegård D.: Association of chondroadherin with collagen type II. *J. Biol. Chem.* (2001), 276 (35), 32883-8

**Naski M.C.**, Colvin J.S., Coffin J.D., Ornitz D.M.: Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* (1998) 125, 4977- 4988

**Ng L.J.**, Wheatley S., Muscat G. E., Conway- Campbell J., Bowles J., Wright E., Bell D.M., Tam P.P., Cheah K.S., Koopman P.: Sox9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* (1997) 183, 108- 121

**Newton C.R.**, Graham A.: PCR. Springer Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford (1997)

**O'Brien T.P.**, Yang G.P., Sanders L., Lau L.F.: Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate- early gene. *Mol. Cell Biol.* (1990) 10, 3569- 3577

**O'Brien T.P.**, Lau L.F.: Expression of the growth factor- inducible immediate early gene *CYR61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Diff.* (1992) 3, 645- 654

**Ortega N.**, Behonick D.J., Werb Z.: Matrix remodelling during enchondral ossification. *TRENDS in Cell Biology* (2004) Vol. 14, 86- 93

**Poole A.**: Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of anatomy* (1997) 191, 1-13

**Rappolee D.A.**, Mark D., Banda M.J., Werb Z.: Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* (1988) 241 (4866), 708-712

**Rousseau F.**, Bonaventure J., Legeai- Mallet L., Pellet A., Rozet J.M., Maroteaux P., Le Merrer M., Munnich A.: Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor – 3 in achondroplasia. *Nature* (1994) 371, 252- 254

**Schütze N.**, Kunzi-Rapp K., Wagemanns R., Noeth U., Jatzke S., Jakob F.: Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CNN. *Protein Expression and Purification* (2005) 42, 219-225

**Schütze N.**, Lechner A., Groll C., Siggelkow H., Hüfner M., Koehrlé J., Jakob F.: The human analogue of murine cysteine rich protein 61 is a  $1\alpha$ -25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: Regulation by cytokines, growth factors and serum. *Endocrinology* (1998) 139, 1761-1770

**Smits P.**, Li P., Mandel J., Zhang Z., Den J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B., Lefebvre V.: The transcription factors L- Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* (2001) 1, 277- 290

**St- Jacques B.**, Hammerschmidt M., McMahon A.P.: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* (1999) 13, 2072- 2086

**Tavormina P.L.**, Shiang R., Thompson L.M., Zhu Y.Z., Wilkin D.J., Lachman R.S., Wilcox W.R., Rimoion D.L., Cohn D.H., Wasmuth J.J.: Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* (1995) 9, 321- 328

**Vertel, B.M.:** The ins and outs of aggrecan. *Trends in Cell Biology* (1995) 5, 458-464

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



**Wagner T.**, Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., Keutel J., Hustert E. et al.: Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY- related gene Sox9. *Cell* (1994) 79, 1111- 1120

**Wong M.**, Kireeva M.L., Kolesnikova T.V., Lau L.F.: CYR61, product of growth factor-inducible immediate- early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev. Biol.* (1997) 192, 492- 508

**Wright E.**, Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A., Koopmann P.: The Sry- related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* (1995) 9, 15- 20

## 7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bFGF	Basic fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor 2)
bp	Basenpaare
Cbfa1	core binding factor $\alpha$ -1 (Kernbindungsfaktor $\alpha$ -1)
CCN	<u>C</u> YR61, <u>C</u> TGF, <u>N</u> OV
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid (komplementäre DNS)
CTGF	Connective tissue growth factor (Bindegewebs Wachstumsfaktor)
CYR61	Cystein-rich protein 61 (Cysteinreiches Protein 61)
DMEM	Dublecco 's Modified Eagle's Medium
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (FGF Rezeptor 3)
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phosphat-dehydrogenase
HMG	high mobility group
HPLC-H <sub>2</sub> O	high performance liquid chromatography water (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Wasser)
HSPG	heperansulfathaltige Proteoglykane
IGFBP	Insulin like growth factor binding protein (Insulinähnliches Wachstumsfaktor Bindungsprotein)
Ihh	Indian hedgehog
ml	Milliliter
M-MLV	Murine Leukemia Virus (Maus Leukämie Virus)
L-Sox5	Large- sex-determining region Y-box5
NOV	Nephroblastoma overexpressed (Nephroblastoma-überexprimierendes Protein)
PDGF	Platelet- derived growth factor (Plättchen abstammender Wachstumsfaktor)
pmol	Pikomol
PTH	Parathyroid hormone (Parathormon)

PTHrP	PTH related peptide (PTH verwandtes Peptid)
RGD	Tripeptidsequenz aus Arginin-Glycib-Aspartat
RT-PCR	reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
shRNA	small hairpin Ribonucleic acid (Haarnadel Ribonukleinsäure)
Sox5, 6, 9	SRY (sex-determining region Y)-box 5, 6, 9
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TSP1	Thrombospondin type I repeat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VWC	von Willebrand factor type C repeat
WISP1- 3	Wnt- induced secreted protein 1-3

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt **Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze**, Leiter des Labors für Molekulare Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg, für die Überlassung dieser Arbeit. Seine engagierte Betreuung und allzeit gewährte Unterstützung haben mir die Bearbeitung dieses Themas und dessen Beendigung erst möglich gemacht. Stets war der persönliche Umgang mit Ihm sehr angenehm und unkompliziert.

Danken möchte ich **Prof. Dr. med. Jochen Eulert**, ehemals Ärztlicher Direktor der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor für Molekulare Experimentelle Orthopädie, und **Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert**, Ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Würzburg, für die Übernahme des Koreferates.

Für die Hilfestellung und praktische Einführung in die Laborarbeit möchte ich den Medizinisch Technischen Assistentinnen des Labors für Molekulare Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg, meinen Dank aussprechen. Insbesondere **Jutta Müller** und **Jutta Schneidereit**.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern **Ayse Tarhan** und **Hasan Göktas** die mir erst das Studium der Humanmedizin und auch diese Promotion durch Ihre täglichen aufmunternden Worte und Ihre stetige Unterstützung in den unterschiedlichsten Dingen ermöglicht haben.

Denjenigen Personen die an dieser Stelle nicht persönlich erwähnt wurden, aber ebenso am Erfolg dieser Arbeit beteiligt waren sei ein Dankeschön ausgesprochen.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

- Name: Volkan Göktas
- Geburtsdatum: 09.12.1976
- Geburtsort: Schweinfurt
- Familienstand: verheiratet
- Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung

---

- 1983 – 1987 Auen Volksschule Schweinfurt, Grundschule
- 1987 – 1996 Franken Landschulheim Schloss Gaibach, Gymnasium
- 1996 Allg. Hochschulreife (Prüfungsfächer: Mathematik, Englisch, Geschichte, Chemie)

### Universitäre Ausbildung

---

- 11/1996 – 03/1997 Studium Informatik, Diplom  
Julius Maximilians Univ. Würzburg
- 05/1997 – 03/1999 Studium Biologie, Diplom  
Julius Maximilians Univ. Würzburg
- 02/1999 Diplom-Vorprüfung Biologie
- 04/1999 – 09/2000 Studium Medizin, vorklinischer Abschnitt  
Univ. Rostock
- 08/2000 Ärztliche Vorprüfung
- 10/2000 – 11/2004 Studium Medizin, klinischer Abschnitt

Julius Maximilians Univ. Würzburg

08/2001	Erstes Staatsexamen
08/2003	Zweites Staatsexamen
11/2004	Drittes Staatsexamen

Klinische Ausbildung-Famulaturen

---

09/2001	<u>Anästhesie</u> , Landeskliniken Salzburg, Österreich
03/2002	<u>Urologie</u> , Julius Maximilians Univ. Würzburg
09/2002	<u>Orthopädie</u> , König Ludwig Haus Würzburg
03/2003	<u>Nuklearmedizin</u> , Gemeinschaftspraxis Drs. Eberhardt Scheubeck, Peppert, Würzburg
04/2003	<u>Augenheilkunde</u> , Julius Maximilians Univ. Würzburg

Klinische Ausbildung-Praktisches Jahr

---

10/2003 – 02/2004	<u>Augenheilkunde</u> , Julius Maximilians Univ. Würzburg
02/2004 – 05/2004	<u>Innere Medizin</u> , Hacettepe Univ. Ankara, Türkei
05/2004 – 08/2004	<u>Chirurgie</u> , Gachon Medical School Incheon, Korea

Klinische Weiterbildung

---

Seit 05/2005 Assistenzarzt Neurochirurgie, Klinikum Fulda

Volkan Göktas