

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik - Klinikum Großhadern  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Interleukin-1 $\beta$  hemmt die Chondrogenese der  
humanen mesenchymalen Stammzellen  
NF- $\kappa$ B abhängig

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
Nathalie Wehling  
aus Leverkusen

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

<b>1. Berichterstatter:</b>	<b>Prof. Dr. med. P. Müller</b>
2. Berichterstatterin:	Priv. Doz. Dr. Dr. Carola Bourquin
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Peter Neth Priv. Doz. Dr. Dominik Hartl
 Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	 Dr. med. M. Pietschmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
 Tag der mündlichen Prüfung:	 13. Januar 2011

**MEINEN ELTERN GEWIDMET**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
1.1	Knorpelersatz – Stand der Wissenschaft	4
1.2	MSC als möglicher Therapieansatz für Knorpel	4
1.3	Ein Problem <i>in situ</i> : Entzündungsmediatoren stören die Chondrogenese	6
1.4	Der NF- $\kappa$ B Signalweg – ein möglicher Angriffspunkt	7
1.4.1	Stand der Wissenschaft	7
1.4.2	Der Mechanismus des NF- $\kappa$ B Signalweg – ein Angriffspunkt für Ad.srI $\kappa$ B	8
1.5	Fragestellung	10
<b>2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden	11
2.1.1	Herstellung des Adenovirus	11
2.1.2	Bestimmung der adenoviralen Transduktionskonzentration	12
2.1.3	Adenovirale Transduktion der Zellkultur	12
2.2	Zellbiologische Methoden	13
2.2.1	Kultivierung von Zellen	13
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	14
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen	14
2.2.4	hBMSC Isolierung	15
2.2.5	Pelletkultur	16
2.3	Analysemethoden	16
2.3.1	Quantifizierung der NF- $\kappa$ B Reporter Expression	16
2.3.2	Western Blot	17
2.3.3	Quantitative Analyse der Pelletgröße	17
2.3.4	Bestimmung des DNS-Gehaltes	18
2.3.5	Quantifizierung der Glykosaminoglykane	18
2.3.6	Histologie	19
2.3.7	Immunhistochemie	19
2.3.8	RNA Isolierung und quantitative PCR	19
2.3.9	Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität	20
2.3.10	Statistik	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>21</b>
3.1	Vorversuche	21
3.1.1	Die Hemmung der TGF- $\beta$ 1 induzierten Chondrogenese aus hBMSC durch IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$	21
3.1.2	Der Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Chondrogenese	24
3.1.3	Die srI $\kappa$ B Überexpression und NF- $\kappa$ B Hemmung in hBMSC Pellets	25
3.2	Die Auswirkungen der NF- $\kappa$ B Hemmung auf die Chondrogenese von hBMSC	28
3.2.1	Vergrößerung der Pelletgröße	29
3.2.2	Der Einfluss des srI $\kappa$ B Gentransfers auf die Chondrogenese der hBMSC bei IL-1 $\beta$ Anwesenheit	30
3.2.3	Resynthese chondrogener Marker	33

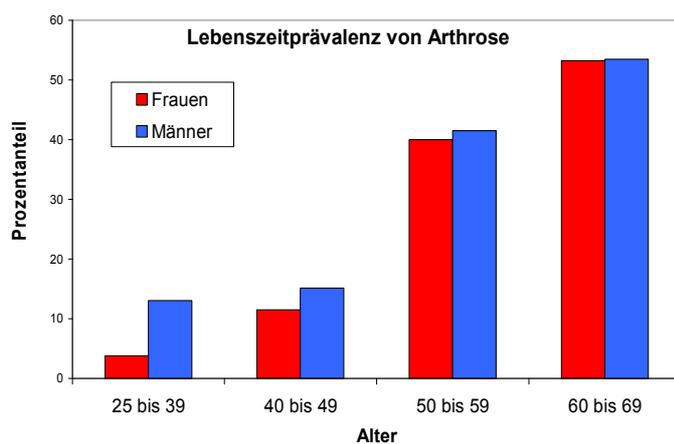
---

3.2.4	Immunhistochemische Untersuchungen	35
3.3	Die alkalische Phosphataseaktivität als Marker der enchondralen Ossifikation	36
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>37</b>
4.1	Kultivierung der hBMSC	37
4.2	Vergleich der Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur	38
4.3	Auswirkungen von Entzündungsmediatoren	38
4.4	Vorhandene Therapien in der Klinik	40
4.5	NF- $\kappa$ B als alternativer Ansatz	41
4.6	Vor- und Nachteile des adenoviralen Gentransfers	41
4.7	Autologe Stammzelltherapie bei chronischen Knorpelschäden?	42
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>45</b>
6.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	45
6.2	Chemikalien und Reagenzien	46
6.3	Fertigkombinationen von Biochemikalien	47
6.4	Rekombinante Faktoren	47
6.5	Antikörper	47
6.5.1	Primärantikörper	47
6.5.2	Sekundärantikörper	48
6.6	Zelllinien / Zellen	48
6.7	Medien	48
6.8	Puffer	48
<b>7</b>	<b>REFERENZEN</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>58</b>

# 1 Einleitung

Arthrose ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung (Engelhardt 2003). Schmerz und Bewegungseinschränkungen machen dem Patienten sehr zu schaffen. Alleine in Deutschland klagen ca. 5 Mio. Menschen über dauerhafte Beschwerden. Der Gesundheitsbericht des Bundes sieht ca. 50% der über 60-Jährigen als betroffen an (Abbildung 1). Die Behandlungskosten der Arthrose werden auf ca. 5 Milliarden €/Jahr geschätzt. Die volkswirtschaftlichen Kosten werden mit 2% aller Arbeitsunfähigkeitstage geschätzt. Ca. 6% der Personen, die in Frührente gehen, führen es auf die Arthrose zurück. Bei entzündlichen-rheumatischen Erkrankungen liegt die Prävalenz in der Bevölkerung bei 1%. Hier verursacht jeder Patient jährlich ca. 5000 € Behandlungskosten. Hinzu kommen Kosten für den krankheitsbedingten Ausfall am Arbeitsplatz in doppelter Höhe (Rheumaliga 2001).

Sowohl bei der Arthrose als auch bei den entzündlichen Gelenkerkrankungen spielt die



**Abbildung 1:** Lebenszeitprävalenz der Arthrose (Quelle: Gesundheitsbericht des Bundes, 1998).

Zerstörung von Knorpel eine zentrale Rolle. Dabei besteht für den Knorpel das Problem, dass er sich selbst kaum regenerieren kann (Ganten 2003). Heute angewandte Therapien zielen hauptsächlich auf die Behebung von Krankheitssymptomen ab, wie die Verminderung von Schmerz, die Verbesserung von Lebensqualität, die Beweglichkeit, die Gehleistung sowie die Verzögerung des Fortschreitens der Arthrose (Leitlinien Gonarthrose,

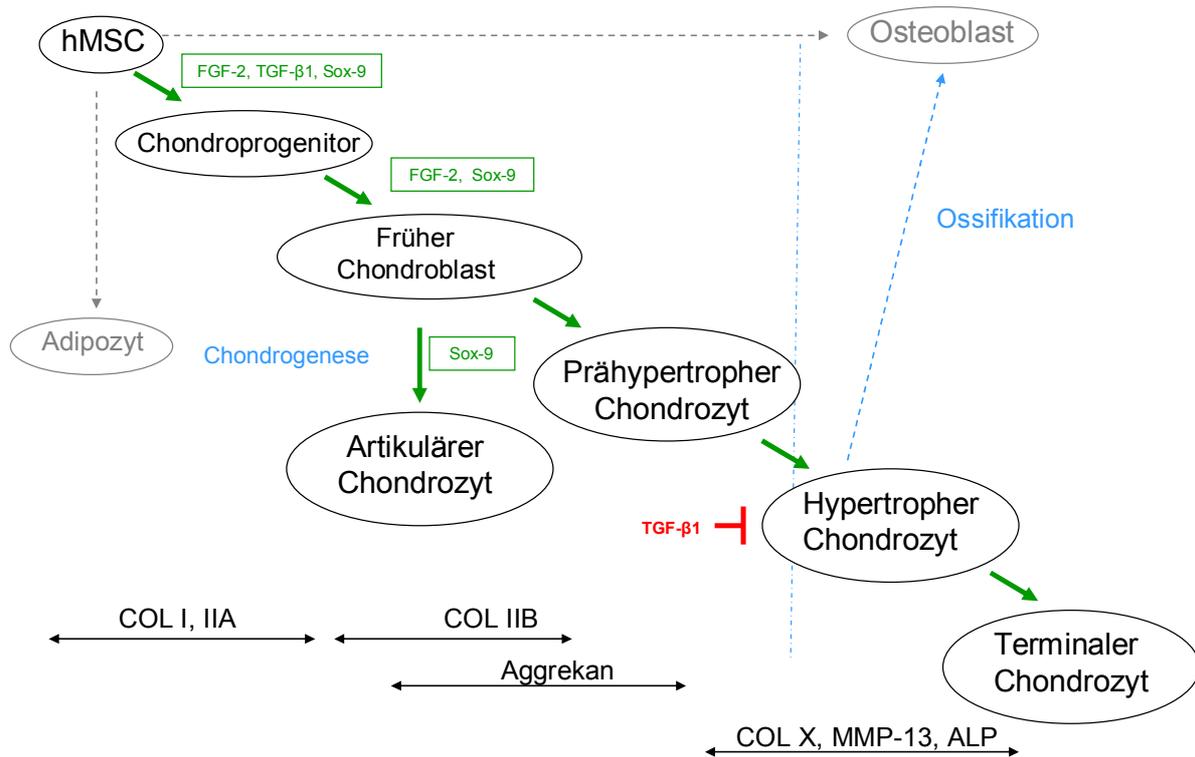
DCOOG). Ziel der Medizin muss jedoch sein, den Knorpel wieder aufzubauen und den damit zugrunde liegenden Pathomechanismus zu adressieren. Dort, wo dies heute durch einen direkten Knorpelersatz im Rahmen einer regenerativen Medizin im Vordergrund steht, ist die Qualität des Ersatzknorpels jedoch eher fragwürdig. Im Regelfall ist ein solcher Ersatzknorpel nur ein mechanisch weniger belastbares Narbengewebe (Skodacek 2005). Dieser so genannte Faserknorpel ist deshalb mit hohen klinischen Defiziten gegenüber dem natürlichen hyalinen Knorpelgewebe versehen. So ist ein traumatischer oder degenerativer Knorpelverlust bis heute nicht vollständig heilbar (Skodacek 2005).

## 1.1 Knorpelersatz – Stand der Wissenschaft

Die heutige Medizin kann somit nur eine Schadensbegrenzung anbieten. Es besteht ein hohes Interesse an alternativen biologischen Ansätzen für den hyalinen Knorpelersatz (Steinert, Ghivizzani et al. 2007). Zukünftige Behandlungsmethoden für Gelenkerkrankungen wie rheumatische Arthritis und Arthrose könnten einen Behandlungsansatz verfolgen, der primär auf die Knorpelregeneration selbst abzielt. Ein möglicher Behandlungsansatz könnte sich aus dem Verständnis der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ergeben, denen die neueste Forschung ein mögliches Potential zur Knorpelregeneration einräumt (Djouad, Mrugala et al. 2006), und deshalb wird dieser Ansatz der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt.

## 1.2 MSC als möglicher Therapieansatz für Knorpel

MSC zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe aus (Pittenger, Mackay et al. 1999). Nach einer theoretisch unbegrenzten Zellvermehrung können sie sich anschließend, wie in Abbildung 2 gezeigt, in mehreren Zelllinien zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten entwickeln. In der hier vorliegenden Studie steht die chondrogene Differenzierung im Vordergrund. Die Stimulierung der MSC mit FGF-2 und TGF- $\beta$ 1 führt über die Chondroprogenitorzellen zu den frühen Chondroblasten. In diesem Stadium wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Sox-9 (Murakami, Lefebvre et al. 2000) entschieden, welchen Typ von Gewebezellen die Differenzierung hervorbringt. Wünschenswert ist die Entwicklung artikulärer Chondrozyten, die mit ihrer extrazellulären Matrix gesundes hyalines Knorpelgewebe bilden (Ganten 2003). Jedoch kann es im Rahmen der enchondralen Ossifikation zur Bildung hypertropher Chondrozyten kommen, die sich abschließend sogar zu Osteoblasten differenzieren können (Aubin 1998). Aus diesem Grund ist die Auswahl der Wachstumsfaktoren im Wachstumsmedium so entscheidend wichtig.



**Abbildung 2:** Chondrogene Differenzierung der hMSC. Modifiziert nach Goldring et al., 2006, Smits et al 2004 und Aubin et al 1998.

Vor diesem Hintergrund sind die MSC als möglicher Ansatz der Zelltherapie zur Knorpelregeneration sehr interessant (Caplan 1991). Ein operativer Vorteil ist, dass sie relativ leicht bei einer Knochenmarksbiopsie an der Crista iliaca entnommen werden können. Der klinische Vorteil ist außerdem, dass mit diesem Verfahren die Ernte der Zellen außerhalb des Gelenks stattfindet und damit nur eine Operation am Gelenk selbst notwendig ist. Somit wird auch die Gefahr einer möglichen Infektion am eröffneten Gelenk gesenkt. Die heutigen Operationen der autologen Chondrozytentransplantation erfordern zwei Eingriffe am betroffenen Gelenk (Ganten 2003).

Allerdings ist noch ein Problem bei der *in vivo*-Anwendung der MSC zu lösen. Das hier verwendete *in vitro* Zellmodell führt dazu, dass sich die MSC in der Pelletkultur zu hypertrophen Chondrozyten entwickeln. Um im Gelenk artikuläre Chondrozyten zu erhalten und damit eine hypertrophe Entwicklung der MSC zu verhindern, müssen im Gelenk die richtigen Signale gegeben sein (Abbildung 2) (Ganten 2003).

Zwei mögliche Wege bieten sich zur Knorpelgewinnung aus hMSC an. Vom Blickwinkel des Tissue Engineerings werden MSC vom Patienten gesammelt, in ein Transplantat verwandelt und anschließend an den Ort des Knorpeldefektes implantiert. Obwohl das Zelltransplantat in einem Bioreaktor zu „reifem“ Knorpel wachsen kann, ist das zunehmend angestrebte Ziel, native Zellen als Transplantat zu implantieren. Die Chondrogenese soll *in situ* stattfinden. Ein alternativer Ort der Gewinnung von MSC liegt im betroffenen Gelenk selbst. Der subchondrale Knochen wird angebohrt, so dass eine Verbindung zwischen Knochenmark und Knorpeldefekt geschaffen ist. Hierfür stehen heute verschiedene chirurgische Techniken wie die Mikrofrakturierung und subchondrale Bohrung zur Verfügung (Simon and Jackson 2006). Der entscheidende Vorteil dieser Techniken ist, dass sie in großen Gelenken arthroskopisch durchgeführt werden können.

Das langfristige Ziel ist ein molekularorthopädischer Ansatz zur Behandlung des Knorpelverschleißes. Dies gilt sowohl für degenerative als auch entzündliche Gelenkerkrankungen.

### 1.3 Ein Problem *in situ*: Entzündungsmediatoren stören die Chondrogenese

Die Reparaturansätze, die auf der *in situ*-Differenzierung von MSC beruhen, sind attraktiv, bergen jedoch eine Besonderheit in sich. In den meisten Fällen muss die chondrogene Differenzierung in einem entzündlichen Milieu stattfinden, denn selbst in den Frühstadien des degenerativen Gelenkverschleißes ist dieser Prozess mit einer Entzündung gekoppelt (Moser 2002). Eine solche Entzündungssituation kann mehrere Ursachen haben. Sie kann durch Krankheitsbilder wie die Arthritis, Trauma oder aber auch ein operativ bedingtes Trauma hervorgerufen sein.

Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) spielen hier als Hauptmediatoren innerhalb des lokalen Entzündungsprozesses eine große Rolle. Dies lässt sich aus Beobachtungen in Tierversuchen zu rheumatischer Arthritis ableiten (Lubberts and van den Berg 2001; Baltzer 2003). Dabei wird TNF- $\alpha$  als Auslöser der akuten Entzündung gesehen, während IL-1 $\beta$  für die Aufrechterhaltung der Entzündung und die Knorpelerosion verantwortlich ist. Eine Gruppe um Joosten et al (Joosten, Helsen et al. 1999) beschreibt, dass die Blockade von IL-1 $\beta$  durch IL-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) bei kollageninduzierter Arthrose eine Hemmung der Knorpel- und Knochenzerstörung bewirkt, während die TNF- $\alpha$  Antagonisierung lediglich zu einer Reduktion der Entzündung führt.

Die Wirkungen von IL-1 $\beta$  bei Knorpelumbauvorgängen lassen sich wie folgt zusammenfassend darstellen (Tabelle 1) (Moser 2002).

**Tabelle 1:** Effekte von IL-1 $\beta$  bei Knorpelumbauvorgängen

<b>IL-1<math>\beta</math> induziert</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> supprimiert</b>
Bildung von MMP's durch Chondrozyten	Synthese von Typ-II-Kollagen
Expression von Adhäsionsmolekülen (Aggrekanasen)	Proliferation von Chondrozyten
Produktion von NO, CoX-2	Proteoglykansynthese
Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten	Knorpelregeneration
<b>=&gt; Verstärkung des Knorpelabbaus</b>	<b>=&gt; Hemmung des Knorpelaufbaus</b>

Der heutige Stand der Wissenschaft zeigt, dass proinflammatorische Zytokine den Knorpelabbau bei der Arthrose stimulieren, während Zytokinantagonisten den Knorpel schützen können (Moser 2002).

## 1.4 Der NF- $\kappa$ B Signalweg – ein möglicher Angriffspunkt

### 1.4.1 Stand der Wissenschaft

Die Literatur beschreibt bereits seit 20 Jahren, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Knorpelmatrixsynthese aus Chondrozyten hemmen (Tyler 1985; Saklatvala 1986). Der Mechanismus ist bekannt: IL-1 $\beta$  aktiviert den Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), der wiederum die Synthese von Sox-9 hemmt. Sox-9, ein weiterer Transkriptionsfaktor, wird jedoch für die Expression des chondrogenen Phänotyps benötigt (Murakami, Lefebvre et al. 2000) (siehe auch Abbildung 2). Es gibt Hinweise, dass dies nach der Transkription von Sox-9 durch die Destabilisierung der sox-9 mRNA geschieht (Sitcheran, Cogswell et al. 2003).

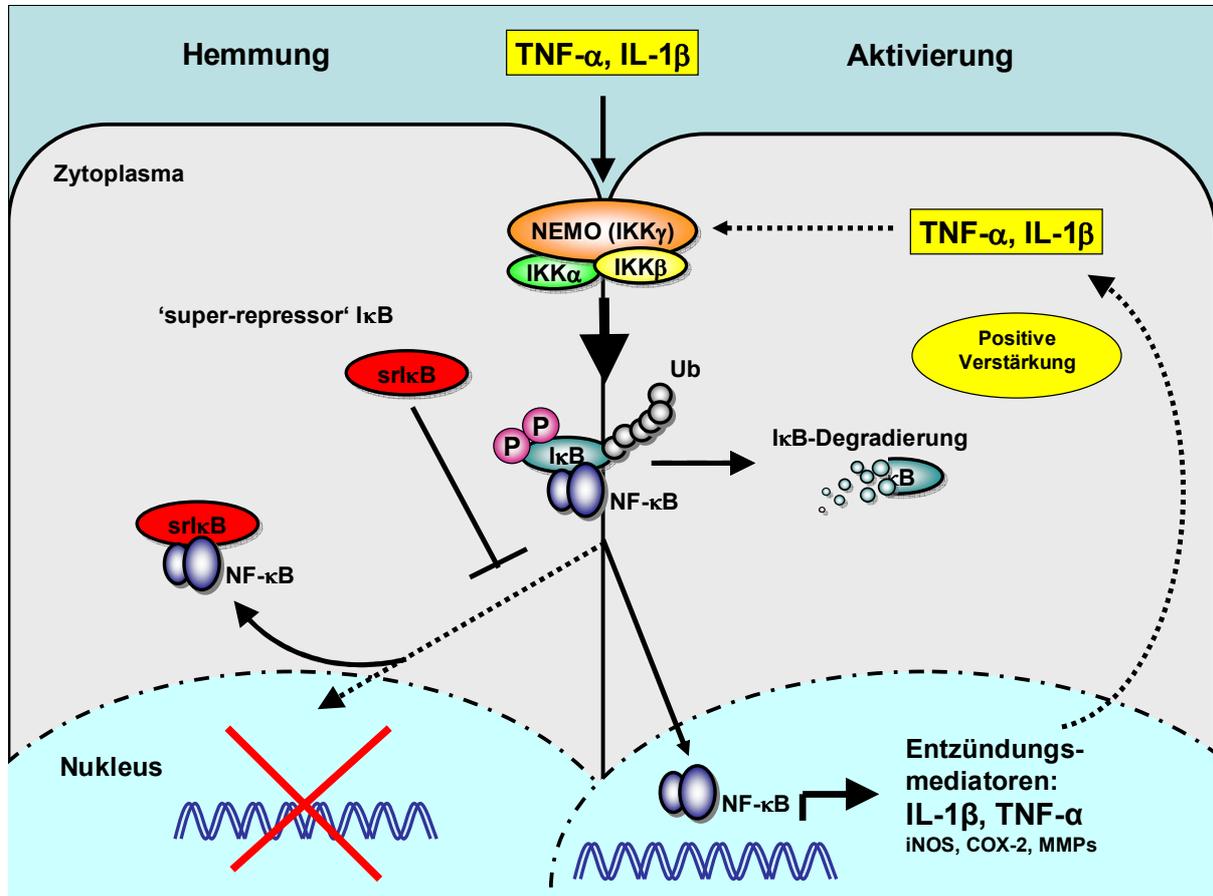
Allerdings ist der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Differenzierung von MSC zu Chondrozyten, also dem oben beschriebenen Prozess der chondrogenen Differenzierungskaskade aus hBMSC (Abbildung 2), noch weitgehend unbekannt. Majumdar et al (Majumdar, Wang et al. 2001) isolierten mesenchymale Zellen aus dem Knochenmark, die für CD 105, einen Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen, positiv färbten. Er kultivierte sie in Alginat-Kulturen und stimulierte die Chondrogenese mit der Zugabe von

Bone Morphogenetic Protein (BMP) -2 und -9. Die Zugabe von IL-1 $\beta$  nach 14 Tagen reduzierte die Menge der mRNA, die für Kollagen II (COL2A1), Aggrecan und Sox-9 kodiert. In einer vergleichbaren Studie benutzte die Gruppe von Sitcheran et al (Sitcheran, Cogswell et al. 2003) eine etablierte Mauszelllinie (MC615) und kultivierte diese als Monolayer in chondroinduktivem Medium mit Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat. Dies stimulierte ebenfalls die Sox-9 mRNA. Die Expression der Sox-9 wurde dann mit TNF- $\alpha$  über den NF- $\kappa$ B Signalweg gehemmt. Im Ergebnis stimmen diese Beschreibungen mit der hier gestellten Hypothese überein, dass IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Chondrogenese von hBMSC hemmen.

#### **1.4.2 Der Mechanismus des NF- $\kappa$ B Signalweg – ein Angriffspunkt für Ad.srl $\kappa$ B**

Entzündliche Erkrankungen werden durch verschiedene Mediatoren, darunter auch Transkriptionsfaktoren, reguliert. Die meisten dieser Faktoren sind zellspezifisch und somit entscheidend für zelluläre Prozesse wie die Proliferation. Andere kommen eher ubiquitär vor und könnten durch die Umgebung beeinflusst werden. Die letztere Gruppe von Transkriptionsfaktoren könnte auch eine Schlüsselrolle in der Immun- und Entzündungsantwort spielen. Hierbei steht der Nuclear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) im Vordergrund (Kopp and Ghosh 1995). Seine Aktivierung hat auch eine antiapoptotische Wirkung, was zu präkanzerogenen Läsionen führen kann, da ältere Zellen überleben, die sonst apoptotisch untergehen würden (Delhalle, Blasius et al. 2004). Dies könnte auch ein Grund sein, warum Miagkov et al (Miagkov, Kovalenko et al. 1998) bei der rheumatischen Arthritis NF- $\kappa$ B als Schlüsselfaktor sehen, da es Prozesse der synovialen Entzündung und Hyperplasie verknüpft. NF- $\kappa$ B ist ein intrazelluläres Heterodimer, welches in seiner aktivierten Form aus zwei Proteinen besteht: p65 (auch relA genannt) und p50. In unstimulierten Zellen liegt NF- $\kappa$ B an I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  (Inhibitor- $\kappa$ B) im Zytoplasma gebunden vor, die das Heterodimer daran hindern, in den Nukleus der Zelle zu wandern (Baldwin 1996). Aktivierungsproteine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulieren eine Inhibitor-Kappa-B-Kinase (IKK-Kinase), die das I $\kappa$ B phosphorylieren, ubiquitinieren und anschließend degradieren (Abbildung 3). Dadurch löst sich NF- $\kappa$ B von I $\kappa$ B und kann in den Nukleus wandern, wo es an die spezifischen Sequenzen der Promoterregionen der Zielgene bindet (Barnes and Karin 1997). Interessanterweise kann NF- $\kappa$ B aufgrund einer  $\kappa$ B Sequenz im I $\kappa$ B Gen die Synthese von I $\kappa$ B stimulieren. Das I $\kappa$ B kann in den Nukleus eintreten, an NF- $\kappa$ B binden und als Dimer gebunden den Nukleus verlassen. Die NF- $\kappa$ B Aktivität der Genexpression im Nukleus wird beendet (Arenzana-Seisdedos, Thompson et al. 1995). Entzündungsmediatoren wie inducible nitric oxid synthase

(iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und viele weitere werden durch den NF- $\kappa$ B Signalweg gebildet. Allerdings werden die Aktivatoren TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auch durch NF- $\kappa$ B gebildet. Es kommt zu einer positiven Selbstverstärkung (Barnes and Karin 1997).



**Abbildung 3:** Der NF- $\kappa$ B Signalweg: Im rechten Teil der Abbildung ist der normale Aktivierungsweg zu sehen. Der linke Teil beschreibt schematisch die Hemmung durch srI $\kappa$ B.

Dieser Teufelskreis kann entweder mit der Blockierung der gebildeten Zytokine unterbrochen werden, oder aber man greift in den NF- $\kappa$ B Signalweg selbst ein.

Die letztere Möglichkeit wird in Abbildung 3 näher erklärt. Hier wird ein Adenovirus verwendet, das die cDNA für einen Super-repressor I $\kappa$ B kodiert. Bei diesem Mutanten von I $\kappa$ B $\alpha$  wurden die Serine 32 und 36 durch Alaninreste (S32A/S36A) ersetzt, um die Phosphorylierung und anschließende Degradierung des transgenen Produktes zu verhindern (Imuro, Nishiura et al. 1998; Jobin, Panja et al. 1998). Im Zytoplasma verdrängt der srI $\kappa$ B nun das native I $\kappa$ B und bindet permanent an das NF- $\kappa$ B Dimer. Es kann zu keiner Translokation des NF- $\kappa$ Bs in den Nukleus kommen, der NF- $\kappa$ B Signalweg wird dementsprechend erfolgreich gehemmt. Somit wird auch der Teufelskreis der zytokininduzierten Entzündung gestoppt.

Diese gewählte Methode kann eingesetzt werden, um den Zusammenhang zwischen der IL-1 induzierten Entzündung und dem NF- $\kappa$ B Signalweg während der Chondrogenese aus hBMSC zu untersuchen.

### 1.5 Fragestellung

Diese Studie soll helfen, die zellulären Vorgänge im Knorpel besser zu verstehen. Möglicherweise haben diese Erkenntnisse sogar entscheidenden Einfluss auf die weitere Entwicklung neuer, effektiver und klinisch anwendbarer Strategien zur Knorpelregeneration im Gelenk. Sie erklären vielleicht auch, warum die Knorpelregeneration im menschlichen Gelenk nicht spontan ablaufen kann.

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des entzündlichen *in situ* Umfeldes auf die Chondrogenese aus humanen, dem Knochenmark entnommenen MSC (hBMSC) *in vitro* untersucht werden.

In einem ersten Schritt werden hBMSC verwendet und in Pelletkulturen über einen Zeitraum von 6 Wochen kultiviert. Zur Stimulierung der Chondrogenese wird dem Kulturmedium der Transforming-Growth Faktor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) hinzugefügt. Das Ziel dieses Vorversuchs ist die wissenschaftliche Bestätigung, dass die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Chondrogenese erfolgreich hemmen. Der weitere Fokus der Experimente liegt auf IL-1 $\beta$ , weil dieses Zytokin auf molekularer Ebene zwischen 100- und 1000fach potenter ist als TNF- $\alpha$  (Moser 2005).

In einem zweiten Versuch werden die hBMSC Pelletkulturen mit einem Adenovirus, der einen  $\kappa$ B trägt, infiziert. Es soll gezeigt werden, dass der benutzte Adenovirus in der Lage ist, die Signalwirkung des NF- $\kappa$ B in den hBMSC Pelletkulturen zu regulieren. Bei diesen Untersuchungen ist der Gentransfer von Vorteil, da mit dieser Methode sichergestellt werden kann, dass der NF- $\kappa$ B Signalweg bei den folgenden Versuchen während der gesamten Kulturperiode von 6 Wochen reguliert wird. Ist dies erfolgreich, können weitere Überlegungen stattfinden.

Es ist nämlich von großem Interesse, welchen Mechanismus die Zytokine wählen, um die Chondrogenese der hBMSC zu hemmen. Es wird vermutet, dass die Hemmung der Chondrogenese durch IL-1 $\beta$  über den NF- $\kappa$ B Signalweg reguliert wird. In einem dritten Schritt untersucht das vorliegende Projekt *in vitro*, ob ein Zusammenhang zwischen dem lokalen von IL-1 $\beta$  induzierten Entzündungsprozess und dem NF- $\kappa$ B Signalweg besteht. Sollte ein Zusammenhang bestehen, stellt sich die Frage, ob der NF- $\kappa$ B Inhibitor die Chondrogenese so stimulieren kann, dass eine qualitativ bessere Knorpelregeneration bewirkt werden kann.

## 2 Methoden

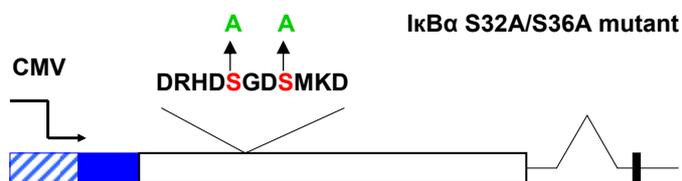
Alle Experimente wurden im Labor von Prof. Chris Evans im Zentrum für Molekulare Orthopädie am Brigham and Women's Hospital der Harvard Medical School in Boston, USA unter der Aufsicht von Dr. Ryan Porter gemacht. Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

Die angewandten molekularbiologischen Methoden umfassen die Herstellung von Adenoviren und die adenovirale Transduktion der Zellkultur.

#### 2.1.1 Herstellung des Adenovirus

Das Adenovirus der ersten Generation ( $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ ), der die cDNA für einen Super-Repressor I $\kappa$ B (srI $\kappa$ B) kodiert und mit einem Cytomegalievirus (CMV) als Promoter besetzt ist, wurde nach den Protokollen von Imuro et al und Jobin et al konstruiert (Imuro, Nishiura et al. 1998; Jobin, Panja et al. 1998).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des I $\kappa$ B $\alpha$  S32A/S36A Mutanten (modifiziert nach Jobin et al, 1998).

Bei diesem Mutanten von I $\kappa$ B $\alpha$  wurden die Serine 32 und 36 durch Alaninreste (S32A/S36A) ersetzt, um die Phosphorylierung und anschließende Degradierung des transgenen Produktes zu verhindern. Das rekombinante Adenovirus, kodierend für die cDNA der Firefly Luciferase (Ad. CMV-Luc) oder für das grün fluoreszierende Protein (Ad.GFP), wurde mit der Methode von Hardy et al (Hardy, Kitamura et al. 1997) und Palmer et al (Palmer, Gouze et al. 2003) konstruiert. Ein gleichartiger Vektor, kodierend für die cDNA der Firefly Luciferase, jedoch mit einer synthetischen NF- $\kappa$ B-spezifischen Promoterregion (Ad.NF- $\kappa$ B-Luc) angetrieben, wurde von Vector Biolabs (Philadelphia, PA, USA) gekauft. Die Firefly-Luciferasen (aus dem Leuchtkäfer) enthalten Luciferol, das mit Sauerstoff und ATP zu Kohlendioxid, AMP und Licht

oxidiert. Diese entstandene Biolumineszenz wurde zur Detektion der gewünschten Stoffe benutzt.

Um einen hohen Virentiter zu erhalten, wurden die rekombinanten Adenoviren in 293CRE8 Zellen, einer humanen Zelllinie, die speziell in der Virologie eingesetzt wird (Hardy, Kitamura et al. 1997), kultiviert und durch drei sukzessive CsCl - Gradienten gereinigt. Nach einer 16-stündigen Dialyse mit 4% Saccharose in 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> wurden die Proben aufgeteilt und bei – 80°C gelagert. Die viralen Titer wurden durch optische Messung (260 nm) und Standard Plaque Assays gemessen. Mit dieser Methode konnten Proben mit ca. 10<sup>12</sup> Viruspartikel (Vp)/ml erreicht werden. Der Quotient Vp zu „plaque forming units“ näherte sich einem Verhältnis von 100:1.

### **2.1.2 Bestimmung der adenoviralen Transduktionskonzentration**

Die optimale Konzentration des Adenovirus für die Transduktion der hBMSC wurde mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die Zellmonolayerkulturen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen des Ad.GFP infiziert: 1. „niedrig“ = 10<sup>4</sup> Vp / Zelle (ohne La<sup>+</sup>); 2. „mittel“ = 10<sup>3</sup> Vp / Zelle + La<sup>+</sup>; 3. „hoch“ = 10<sup>4</sup> Vp / Zelle + La<sup>+</sup>. Nach 6 Tagen in Kultur wurden die Zellen trypsiniert und mit PBS gewaschen. Mit 20.000 Zellen pro Gruppe wurden diese in dem Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) Durchflusszytometer mit einem Bandpassfilter bei 525 nm gemessen.

### **2.1.3 Adenovirale Transduktion der Zellkultur**

Die für die Differenzierungskulturen gezüchteten hBMSC wurden mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1x10<sup>3</sup> oder 1x10<sup>4</sup> Vp/Zelle) des Ad.GFP oder Ad.srlkB im serum-freien Dulbecco's Modified Eagles Medium - High Glucose (DMEM-HG, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) im Zellinkubator für zwei Stunden laut Palmer's Protokoll (Palmer, Gouze et al. 2003) inkubiert. Für Versuche, die einen hohen Prozentsatz von transgen-exprimierenden Zellen benötigen, wurde die virale Transduktion mit einer Kopräzipitation von Lanthanphosphaten optimiert (Palmer, Stoddart et al. 2008). Bei dieser Methode wurden dehydrierte Lanthanchloridsalze (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) in deionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von 0,4 M (pH 5,5-6,0) aufgelöst. Dabei wurde 1 M NaOH benutzt, um ein Ausfällen der Lanthansalze zu verhindern. Die viralen Lösungen wurden auf die im Text genannten Konzentrationen in serum-freien DMEM verdünnt. Ausreichend Volumen von LaCl<sub>3</sub> wurde zu diesen Lösungen hinzugefügt, um eine endgültige Konzentration von 0,2 mM zu erhalten. Diese Mischungen wurden auf dem

Vortexer geschüttelt und bei Zimmertemperatur für 15 Minuten direkt vor der Infektion inkubiert. Nach der La-Adenovirus Komplexierung wurden jeweils 5 ml dieser Lösung in jede Zellkulturflasche pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Weitere 5 ml DMEM und 10 % fötales bovines Serum (FBS, Stem Cell Technologies, USA) wurden hinzugefügt. Die Inkubation wurde für weitere 90 Minuten fortgesetzt. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand verworfen und mit frischem Wachstumsmedium und 10 ng/ml Fibroblast-growth factor (FGF-2, Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA) ersetzt. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen für die Pelletkulturen verwendet.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Die angewandten zellbiologischen Methoden umfassen die Kultivierung von Zellen, die Bestimmung der Zellzahl und das Einfrieren beziehungsweise das Auftauen von Kulturzellen. Grundlegender Bestandteil der Arbeit war die hBMSC Isolierung und die Kultivierung der Zellen in einer Pelletkultur. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Medien und Lösungen vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C zeitnah am Experiment erwärmt.

### 2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) kultiviert. Die Zelllinie 293CRE8 wurde in DMEM-HG, 10% fötalem Kälberserum (FBS, Stem Cell Technologies) und 1% AbAm gezüchtet. Die hBMSC wurden in Kulturmedium mit DMEM-low glucose (DMEM-LG, beinhaltet L-Glutamin und Natriumpyruvat, Invitrogen), 10% FBS, 1% antibiotischem-antimykotischem Cocktail (AbAm, Invitrogen) und Fibroblast-growth-factor (FGF-2, Pepro Tech) kultiviert. FGF-2 wurde hinzugefügt, um das chondrogene Potential der kultivierten hBMSC zu erhalten (Solchaga, Penick et al. 2005). Alle 3 bis 4 Tage wurde das Medium gewechselt. Die in der Primärkultur liegenden hBMSC wurden nach zwei Wochen als adhärenzte Zellen bei maximal 70% Konfluenz mit 0,05% Trypsin, EDTA Puffer (beide Invitrogen) von der Oberfläche gelöst. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit der EDTA/Trypsin Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Bei erfolgreicher Ablösung der Zellen, die im Mikroskop kontrolliert wurde, wurde die Reaktion mit Standardmedium gestoppt. Die Schlüsselfaktoren waren die im FBS enthaltenen Proteinaseinhibitoren, die das Trypsin inaktivieren. Nach der Sedimentierung (400 G, 5 Minuten) wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. 1/10 der Zellen wurden

jeweils in eine Zellkulturflasche mit 12 ml Kulturmedium überführt. Das beschriebene Verfahren wurde für die Expandierung der hBMSC bis zu dreimal wiederholt.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau verdünnt (jeweils 50  $\mu$ l), um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Da dieser Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen wird und diese sich dunkelblau färben, ist eine Unterscheidung im Mikroskop möglich. Für eine genaue Zellzählung wurden die Zellen in 2 Hämazytometern (HZ) jeweils in allen 9 Großquadraten gezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension kann mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{(\text{Zellzahl HZ \#1} + \text{Zellzahl HZ \#2})}{9 \times 2} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

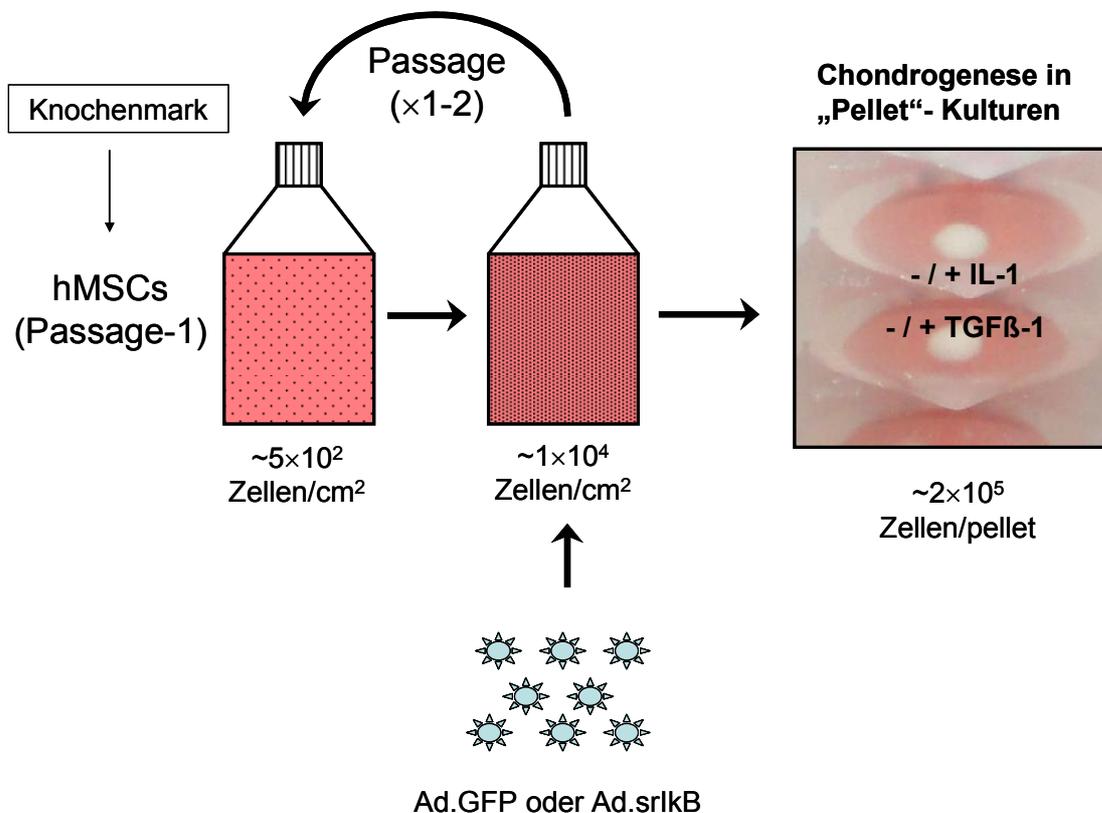
### 2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Nach der Isolierung und Expandierung der hBMSC wurden die überschüssigen Kulturzellen im DMSO - Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70% von den Zellkulturplatten abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension bei 400 G für 5 Minuten zentrifugiert und der Zellüberstand verworfen. Mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/1ml Medium wurden die Zellen in 4°C kaltem DMSO-Medium resuspendiert, in 1 ml Aliquots in Kryogefäße überführt und für eine Stunde in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Zum Schutz der Kulturzellen wurden diese nun schrittweise eingefroren. Mit einstündigem Zeitabstand wurden die Zellen jeweils erst bei - 20°C, dann bei - 80°C und abschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Vor Beginn eines neuen Experiments wurden die eingefrorenen Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort nach Verflüssigung des Mediums mit Standardmedium verdünnt. Die Zellen wurden bei 400 G 10 Minuten zentrifugiert, abschließend in eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt und kultiviert.

### 2.2.4 hBMSC Isolierung

Hauptbezugsquelle der hBMSC ist das Knochenmark. In dieser Arbeit wurde es Patienten im Alter von 71-78 Jahren während einer totalen Hüftendoprothesenoperation im Brigham and Women's Hospital (Boston, MA, USA) entnommen. Im Einverständnis mit dem Gremium der Harvard Medical School in Boston (MA, USA) ist die Operation nach den Vorgaben von Porter et al (Porter 2008) abgelaufen. Das Material wurde mit einem Reamer Irrigator Aspirator (Synthesis, Paoli, PA, USA) gewonnen, mit einem „in-line Biomed Redi-Flow® open pore“-Filter gereinigt und in einem sterilen Behälter aufgefangen. Anschließend wurden die zellkernhaltigen Zellen mittels einer 30-minütigen Dichtegradientenzentrifugation bei 400 G (Ficoll-Plaque™ PLUS (Stem Cell Technologies)) isoliert. Mononukleare Zellen wurden mit  $5 \times 10^7$  zellkernhaltigen Zellen pro Zellkulturflasche in Zellkulturflaschen ( $75 \text{cm}^2$ ) im Kulturmedium, wie in 2.2.3.1 beschrieben, kultiviert. Je nach Gruppe wurden die Zellen dann zwei Tage vor der Differenzierung mit dem Adenovirus, wie in 2.2.2.2. beschrieben, infiziert. Die Plastizität der Stammzellen wurde im Vorhinein über die Differenzierung in Richtung der adipogenen, chondro- und osteoblastären Linie im Labor getestet.



**Abbildung 5:** Zellkulturmodell: Passage-1 hBMSC wurden expandiert und mit Ad.GFP oder verschiedenen Konzentrationen von Ad.srIκB infiziert. Innerhalb der Pelletkultur wurde durch verschiedene Faktoren die chondrogene Differenzierung induziert.

### 2.2.5 Pelletkultur

Die chondrogene Differenzierung der hBMSC erfolgte nach allgemein anerkanntem Verfahren (Yoo, Barthel et al. 1998; Penick, Solchaga et al. 2005). Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in einer Lösung mit serumfreien DMEM-HG mit 1% AbAm gemischt und möglichst homogen auf 200  $\mu$ l große Proben jeweils in eine Vertiefung der 96-Mikrotiterplatten (Spitzboden, Corning, Corning, USA) verteilt. Die Platten bestanden aus Polypropylen, damit die Zellen nicht wie bei den Polystyrenwänden, die speziell für Zellkulturen hergestellt werden, haften bleiben. Bei 400 G wurden die Zellen für 5 min zentrifugiert, um ein Zellpellet am Zellboden zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen und mit chondrogenem Wachstumsmedium (CWM) ersetzt. Dieses Medium bestand aus DMEM-High Glucose (Invitrogen: beinhaltet L-Glutamin und Natriumpyruvat), 1% AbAm, 1% IST + Premix (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 40  $\mu$ g/ml Prolin (Sigma-Aldrich), 100 nM Dexamethason (Sigma-Aldrich) und 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma-Aldrich). Je nach Studiengruppe wurde zusätzlich rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, PeproTech) und/oder IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) als Entzündungsstimulator hinzugefügt (Fontana, Hengartner et al. 1982). TGF- $\beta$ 1 agierte hier als Wachstums- und Differenzierungsfaktor und verbesserte die Chondrogenese der hBMSC (Hanada, Solchaga et al. 2001). Die Pellets haben innerhalb der ersten 24 Stunden frei schwimmende Zellaggregate geformt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellaggregate wurden am Tag 42 geerntet und für weitere knorpelspezifische Untersuchungen herangezogen.

## 2.3 Analysemethoden

Folgende Methoden wurden für die genaue Untersuchung der Zellen verwendet:

### 2.3.1 Quantifizierung der NF- $\kappa$ B Reporter Expression

Die NF- $\kappa$ B Aktivität in den hBMSC wurde mit dem Ad.NF- $\kappa$ B-Luc gemessen. Zellen bei 70-80% Konfluenz wurden entweder mit  $1 \times 10^4$  Vp/Zelle Ad.NF- $\kappa$ B-Luc oder Ad.CMV-Luc für zwei Stunden transduziert und über Nacht im Wachstumsmedium kultiviert. Jede Zellkulturflasche der zwei Luciferase-Vektorgruppen wurde am nächsten Morgen mit einer der folgenden Untergruppen infiziert: kein Virus;  $1 \times 10^4$  Vp/Zelle Ad.GFP + La<sup>3+</sup> (0,2 mM); „niedriges Ad.srI $\kappa$ B“ =  $1 \times 10^4$  Vp/Zelle; „mittleres Ad.srI $\kappa$ B“ =  $1 \times 10^3$  Vp/Zelle + La<sup>3+</sup> oder „hohes Ad.srI $\kappa$ B“ =  $1 \times 10^4$  Vp/Zelle + La<sup>3+</sup> (0,2 mM). Nach einer wiederholten Nachtinkubation wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zu Aggregaten geformt und für 5 weitere Tage in

CWM mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 kultiviert. Am fünften Tag wurde bei der Hälfte der Pellets das Medium zu CWM mit TGF- $\beta$ 1 und IL-1 (10 ng/ml) gewechselt. Nach 5 Stunden wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Pellets wurden mit jeweils 200  $\mu$ l GLO Lysis Puffer (Promega, Madison, WI, USA) behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde mittels einem Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System (Promega) bestimmt. Die Messungen der Ad.NF- $\kappa$ B-Luc Gruppe wurden mit den übereinstimmenden Werten der Ad.CMV-Luc Gruppe normalisiert. Dies diente der Ausschließung möglicher Effekte, die mit einer allgemeinen Aufnahme und NF- $\kappa$ B aktivitätsunabhängigen Expressierung des rekombinanten Adenovirus zusammenhängen.

### 2.3.2 Western Blot

Für den Nachweis des I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins in den Zellkulturen wurde eine weitere Versuchsreihe gestartet. Nach sieben Tagen in der Kultur mit CWM und TGF- $\beta$ 1 wurden die Zellaggregate mit Laemmli Puffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) behandelt und geerntet. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Lowry Methode mit einem RC/DC Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA) bestimmt, mit bekanntem Proteinlevel von 20 - 40  $\mu$ g auf einem 10% SDS-PAGE Polyacrylamid Gel gelöst und mittels einer PDVF Membran übertragen. Mit Hilfe folgender Antikörper konnten die Proteinbanden identifiziert werden: humanes I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:200 Verdünnung, 37kDa), phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:200, 41 kDa) und  $\beta$ -Aktin (1:100.000, 43 kDa) (alle Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Der Sekundärantikörper war ein HRP-konjugiertes Ziegen Anti-Hase IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA). Die Banden wurden mit einem Western Lightning<sup>TM</sup> Chemilumineszenz System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) und einer Kodac Image Station 2000MM visualisiert.

### 2.3.3 Quantitative Analyse der Pelletgröße

Nach 6 Wochen in der Zellkultur wurden die Pellets mit PBS gewaschen und in den Mikrotiterplatten digital photographiert. Diese Bilder wurden mit Hilfe der ImageJ Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) analysiert, indem die Querschnittsfläche gemessen wurde. Die Flächenmessungen wurden anschließend mittels einer bekannten Referenzgröße von pixel<sup>2</sup> zu mm<sup>2</sup> umgewandelt.

### 2.3.4 Bestimmung des DNS-Gehaltes

Der DNS-Gehalt der Zellaggregate wurde mit dem Hoechst Dye 33258 Protokoll (Kim, Sah et al. 1988) gemessen und diente zur Normalisierung anderer Messwerte. Die Proben wurden mit einem Proteinase K-Puffer (30 mM Tris (pH 7,8), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) über Nacht bei 65°C extrahiert und dann jeweils dreimal eingefroren und jeweils wieder aufgetaut. Die Volumina der Pelletkultur erlaubten nur ein Messvolumen von 25 µl der Pelletprobe, die mit 1,975 ml der Arbeitslösung vermischt wurden. Diese bestand aus 100 ng/ml Hoechst Dye 33258 (Sigma-Aldrich) in 10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA und 100 mM NaCl Puffer. Die Fluoreszenz wurde direkt im Anschluss bei 440-470 nm auf einem DQ300 Fluorometer (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA) gemessen. Anschließend konnte mit Hilfe eines zertifizierten DNS Standards aus Kalbthymus (Sigma-Aldrich) der DNS-Gehalt berechnet werden.

$$\text{DNS-Gehalt } (\mu\text{g/Pellet}) = \frac{(\text{Probenwert} - \text{Achsenabschnitt})}{\text{Steigung}} \times \frac{\text{Behältervolumen}}{\text{Probenvolumen}}$$

(Achsenabschnitt und Steigung konnte durch die Geraden der Normalwerte berechnet werden)

### 2.3.5 Quantifizierung der Glykosaminoglykane

Um die Knorpelqualität quantitativ bewerten zu können, wurde der Glykosaminoglykangehalt (GAG) mit einem UVmax Kinetic Mikroplattenlesegerät (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA) gemessen. Für diese Untersuchung wurden ebenfalls Protein K-Extrakte benutzt. Dabei wurden die Schritte des „Dimethylmethylenblau (DMMB) Dye Binding Assays“ (Farndale, Buttle et al. 1986) verfolgt, die im Folgenden dargestellt werden: 40 µl der Proben (oder der einzelnen Verdünnungsreihen) wurden mit 250 µl DMMB Lösung zusammen pipettiert und bei 595 nm gemessen. Die GAG-Konzentrationen wurden mittels einer Standardkurve von Chondroitin-Sulfat (Spezies: Hai; Sigma-Aldrich) berechnet und mit dem jeweiligen DNS-Gehalt einer Probe normalisiert.

### 2.3.6 Histologie

Die Zellaggregate wurden für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, für eine bessere Handhabung in 0,5% Agarose Gel gegossen, in Paraffin eingebettet und schließlich mit einer Dicke von 5 µm mittels Kryostaten geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen, mit drei Xylolwaschungen für je 5 Minuten deparaffinisiert und in abgestuften Alkohollösungen rehydriert. Zur Erkennung der Proteoglykanmatrix im Knorpel wurden repräsentative Schnitte mit 1% Toluidinblau (Sigma-Aldrich), pH 3,0 für 30 Minuten gefärbt. Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, in abgestuften Alkohollösungen dehydriert und wieder mit drei Xylolwaschungen gereinigt. Abschließend wurden die Präparate mit Cytoaseal™ XYL Mountain Medium (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) bedeckt.

### 2.3.7 Immunhistochemie

Neben der Toluidinblaufärbung wurden weitere Schnitte immunhistologisch angefärbt. Endogene Peroxidasen wurden mit Wasserstoffperoxidlösungen neutralisiert und die Knorpelschnitte wurden mit 0,1 U/ml Chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich) in PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) bei 37°C für eine Stunde gelöst. Nach Hemmung mit 1% BSA und einstündiger Inkubation mit 10% Affenserum in PBS wurden die Objektträger mit polyklonalen Ziegen-Anti-Humanen Kollagen Typ I oder Typ II Antikörpern (beide von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) oder Ziegen Anti-Kollagen Typ X (ein Geschenk von Gary Gibson, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, USA) über Nacht bei 2-8°C inkubiert. Antigene wurden mit einem sekundären Biotin-konjugierten Affen Anti-Ziege Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) und einem Streptavidin-Merretichperoxidase Markierungskit (Dako, Carpinteria, CA, USA) unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) visualisiert. Die Objektträger wurden gereinigt, mit Hematoxylin gegengefärbt, dehydriert, mit Sicherheitsplättchen abgedeckt und mit dem Leica DM LB Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) digital photographiert.

### 2.3.8 RNA Isolierung und quantitative PCR

Die Gesamt-RNA wurde aus den MSC Pellets (3 pro Gruppe) extrahiert, in einem Pyrex Tissue Grinder (Wheaton) homogenisiert und in RLT Puffer (Quiagen) lysiert. Die RNA wurde mit RNAeasy Microkit Reagenzien (Qiagen) laut deren Protokoll gereinigt. Für die cDNA Synthese wurden 0,2 µg gesamter RNA in jeder Gruppe mit Oligo- (Brandt)<sub>18</sub> Primern und der Super

Script III Reversetranskriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Das cDNA Produkt wurde dreifach verdünnt. 2 µl der jeweiligen Probe wurden für die Amplifikationen durch die quantitative PCR verwendet. Die real-time PCR Primer für alle spezifischen Gene wurden bei Applied Biosystems erworben.

Die quantitative Real-Time PCR wurde mittels der TaqMan Technologie in dem ABI PRISM 7300 Gerät (Applied Biosystems) ausgeführt. Die Parameter für die PCR Reaktion waren folgende: Das Reaktionsgemisch bestand aus 2 µl cDNA und 7 µl dH<sub>2</sub>O, die mit 10 µl Master Mix 2X Puffer (Applied Biosystems) und 1 µl TaqMan Primer zu einem endgültigem Volumen von 20 µl vermischt wurden. Während eines PCR Zyklus wurde die Probe für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Dem folgten 40 Amplifikationszyklen (95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 60 Sekunden). Zur Minimierung unerwünschter Effekte, die durch verschiedene Startkonzentrationen der RNA oder mögliche Unbeständigkeiten innerhalb der Gruppen hervorgerufen werden konnten, wurden die Expressionslevel des jeweiligen Gens mit GAPDH normalisiert. Hierfür wurde die 2- delta-CT-Methode (Livak and Schmittgen 2001) verwendet.

### **2.3.9 Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität**

Die alkalische Phosphataseaktivität dient als Indikator für den Grad der Mineralisierung der differenzierten Zellen. Zu ihrer quantitativen Auswertung wurden die Pellets, wie in 2.2.3.8. beschrieben, homogenisiert und in 0,25 ml Triton X-100 verdünnt. Diese AP-Aktivität wurde nach der Methode von Teixeira et al (Teixeira, Hatori et al. 1995) gemessen, indem *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat in einen Puffer mit 0,15 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,1 M MgCl<sub>2</sub> und 0,1 M ZnCl<sub>2</sub> pipettiert wurde. Die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat wurde durch den Wechsel in seiner optischen Dichte bei 410 nm gemessen. Die Einheit ist nmol des Produktes/min/mg Protein und eine Absorptionseinheit beträgt 64 nmol des Produktes. Die einzelnen Probenwerte wurden mit dem gesamten Proteingehalt normalisiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit (Biorad) bestimmt.

### **2.3.10 Statistik**

Die Zellaggregatexperimente wurden mindestens dreimal mit hBMSC von verschiedenen Patientenquellen wiederholt. Repräsentative Datensätze der Studienergebnisse wurden dargestellt. Innerhalb eines einzelnen Experiments wurden statistische Signifikanzen zwischen den Behandlungsgruppen unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten Student'schen-T-Tests berechnet.

### 3 Ergebnisse

Meine Hypothese lautet, dass proinflammatorische Zytokine die Chondrogenese aus hBMSC NF- $\kappa$ B abhängig hemmen. Basis meiner Hypothese ist zunächst der Nachweis, dass proinflammatorische Zytokine überhaupt einen Einfluss auf die Chondrogenese von hBMSC haben. Ist dies der Fall, ist in einem zweiten Schritt zu prüfen, ob dieser Einfluss im Zusammenhang mit dem Signalweg von NF- $\kappa$ B steht.

#### 3.1 Vorversuche

Bisher fehlen genauere Untersuchungen dazu, welchen Einfluss proinflammatorische Zytokine auf die Regulation der Chondrogenese aus hBMSC haben. Studien aus der Vergangenheit zeigen, dass exogenes IL-1 $\beta$  die Expression chondrogener Marker in humanen mesenchymalen Vorläuferzellen *in vitro* hemmt (Majumdar, Wang et al. 2001; Derfoul, Miyoshi et al. 2007). Also wurde zuerst der Einfluss von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf die TGF- $\beta$ 1 induzierte Chondrogenese der hBMSC untersucht.

##### 3.1.1 Die Hemmung der TGF- $\beta$ 1 induzierten Chondrogenese aus hBMSC durch IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$

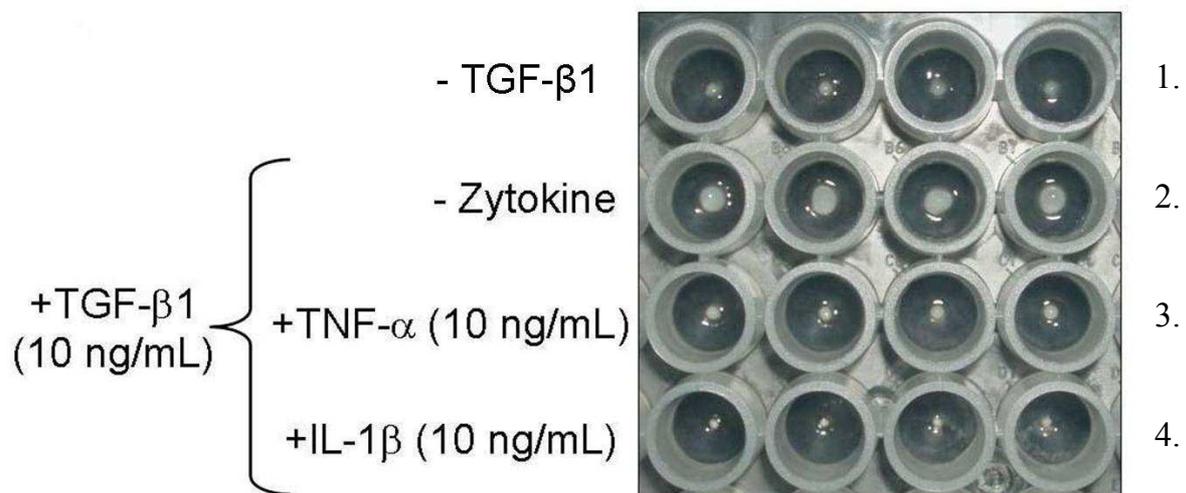
Zum Vergleich der Effekte wurden folgende vier Gruppen gebildet (Tabelle 2): Bei der negativen Kontrollgruppe wurde auf die Induktion mit TGF- $\beta$ 1 verzichtet. Bei der positiven Kontrollgruppe wurde zwar die Chondrogenese mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 stimuliert, Entzündungsstimulatoren wurden jedoch nicht hinzugefügt. Dagegen wurde die TGF- $\beta$ 1 induzierte Chondrogenese jeweils entweder mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  angereichert und mit den anderen Referenzgruppen verglichen.

**Tabelle 2:** Gruppeneinteilung der Vorversuche

Gruppe	-/+ TGF- $\beta$ 1	Entzündungsstimulator
1	-	-
2	+ TGF- $\beta$ 1	-
3	+ TGF- $\beta$ 1	+ TNF- $\alpha$
4	+ TGF- $\beta$ 1	+ IL-1 $\beta$

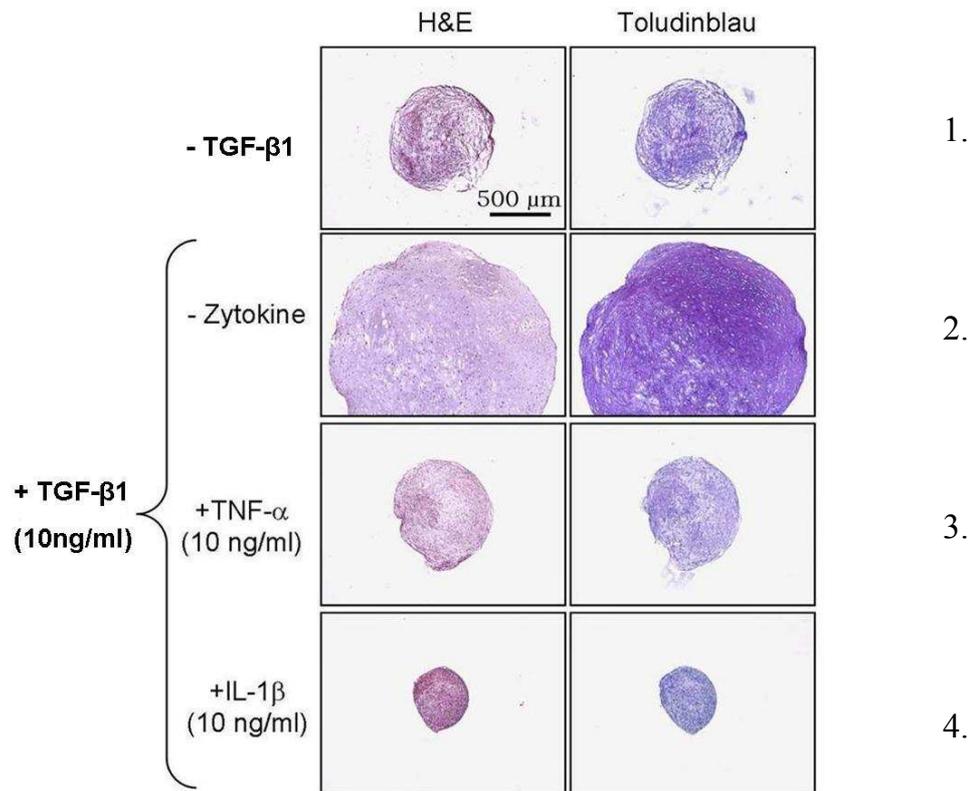
Abbildung 6 macht deutlich, dass die alleinige Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 das Wachstum der Pellets (zweite Reihe in der Abbildung) nach 6 Wochen deutlich stärker stimuliert. Die

Zellen innerhalb dieser Aggregate sind mit extrazellulärer, Proteoglykan-reicher Matrix umgeben und wurden durch die histologische Toluidinblaufärbung sichtbar gemacht (Abbildung 7, zweite Reihe in der Abbildung). Allerdings wurde dieser positive Effekt durch die Kostimulierung mit TNF- $\alpha$  (dritte Reihe) oder IL-1 $\beta$  (vierte Reihe) neutralisiert. Die Pelletgröße und Proteoglykanfärbung sind jetzt nur noch mit der negativen Kontrollgruppe („- TGF“, erste Reihe) vergleichbar. Quantitative Messungen des GAG-Gehalts bestätigen, dass beide Zytokine die TGF- $\beta$ 1 induzierte Zunahme der GAG-Synthese hemmen (Abbildung 8).

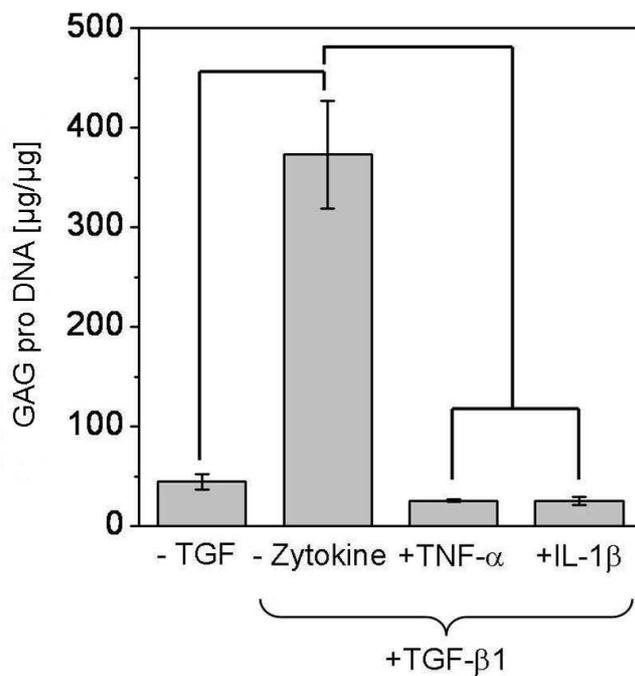


#### Abbildung 6

Die Hemmung der TGF-induzierten Chondrogenese durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Humane BMSC (hBMSC) wurden für 6 Wochen in den oben beschriebenen Pellets kultiviert. Die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) zum CWM hat die Pelletgröße im Vergleich zum Basismedium deutlich vergrößert. Dagegen blockierte die Zugabe von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  (je 10 ng/ml) das Wachstum der Pellets.

**Abbildung 7**

Die histologische Auswertung zeigt eine homogene hohe Zellpopulation (H/E-Färbung) innerhalb ihrer Proteoglykanmatrix (Toludinblau) der TGF-β1-behandelten Pellets. Aggregate, die mit IL-1β oder TNF-α behandelt wurden, zeigen eine hohe Zellpopulation auf, jedoch eine unzureichende Toludinblaufärbung.

**Abbildung 8**

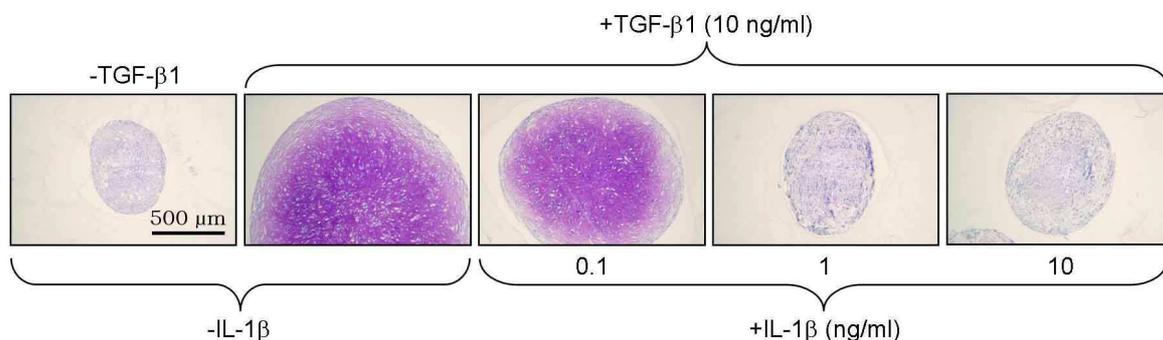
Der GAG-Gehalt der Pellets wurde mittels DMMB-Methode quantitativ gemessen. Die massive Blockierung des hohen GAG-Gehalts der TGF-β1-induzierten Pellets durch die Kostimulation mit IL-1β und TNF-α bestätigt die histologischen Beobachtungen. Die Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Versuchsgruppen ( $n=3$  Pellets).

### 3.1.2 Der Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Chondrogenese

Wenn IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in einer bestimmten Konzentration die Chondrogenese hemmen, liegt es nahe zu prüfen, ob diese Hemmung auch dosisabhängig nachweisbar ist. Für die verbleibenden Versuche wurde der Fokus auf IL-1 $\beta$  gelegt, da dieses Zytokin sowohl bei Arthrose wie auch bei der rheumatischen Arthritis eine entscheidende Rolle spielt (Moser 2005).

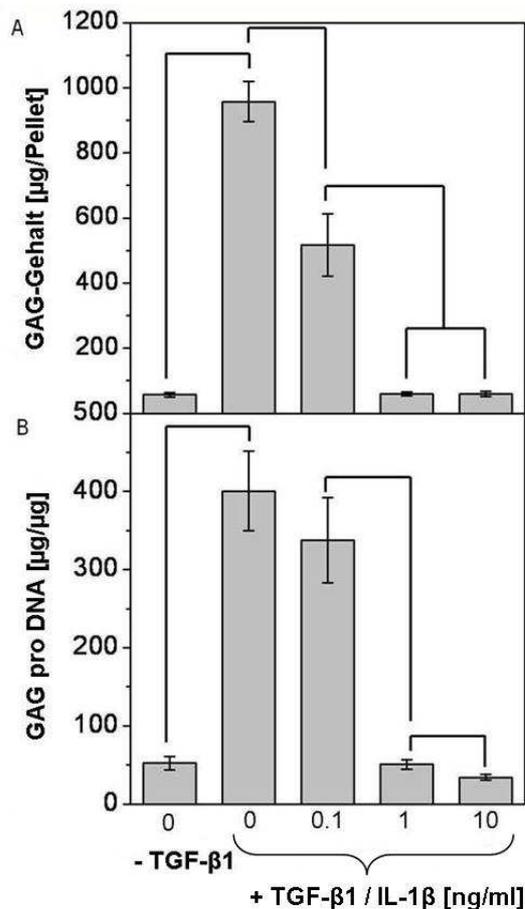
Die negative Kontrollgruppe enthielt wie auch im vorherigen Versuch keine Stimulatoren. Bei der positiven Kontrollgruppe fehlt IL-1 $\beta$ . Bei den weiteren Versuchgruppen wurde die Konzentration von IL-1 $\beta$  wie folgt festgelegt: 0,1, 1 und 10 ng/ml IL-1 $\beta$ .

Abbildung 9 veranschaulicht deutlich die Korrelation zwischen der Dosis von IL-1 $\beta$  und dem Grad der chondrogenen Differenzierung. Je höher die Dosis von IL-1 $\beta$ , desto stärker lässt sich eine Hemmung der Chondrogenese durch die Verkleinerung der Pelletgröße feststellen. Dies belegt auch die histologische Auswertung der Toluidinblaufärbung, die mit der Erhöhung der Dosis von IL-1 $\beta$  qualitativ deutlich abnimmt.



**Abbildung 9**

Die Hemmung der positiven TGF- $\beta$ 1-Auswirkungen durch IL-1 $\beta$  ist dosisabhängig. Die Pelletgröße nahm ab einer Konzentration von über 0,1 ng/ml deutlich sichtbar ab.



**Abbildung 10**

Die GAG – Messungen (n = 4 Pellets pro Gruppe) bestätigen die sichtbare histologische Auswertung, dass IL-1 $\beta$  die Chondrogenese aus hBMSC ab einer Konzentration über 0,1 ng/ml hemmt:

A. GAG-Gehalt pro Pellet.

B. Der GAG-Gehalt wurde mit dem DNA Gehalt des jeweiligen Pellet normalisiert.

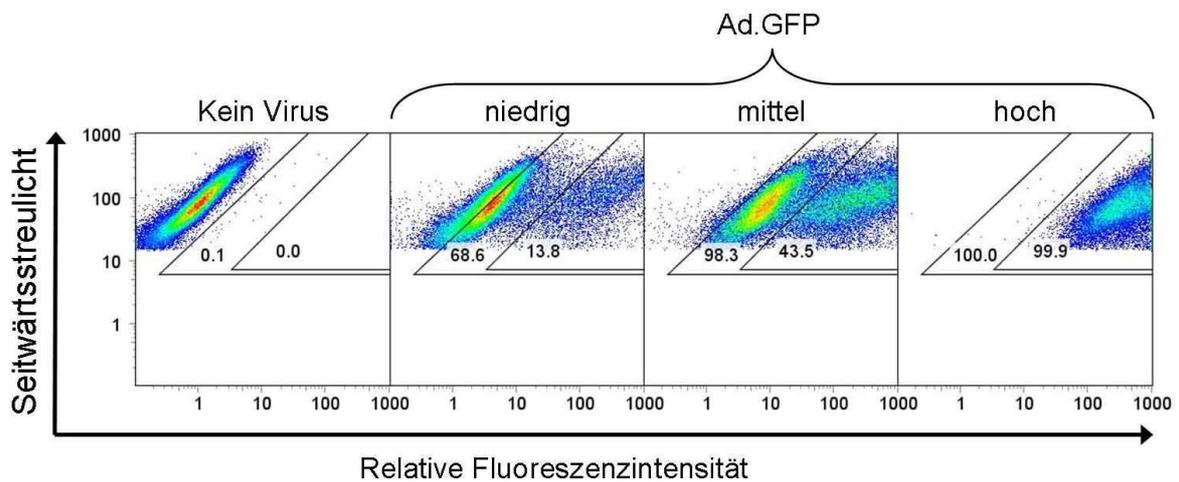
### 3.1.3 Die srI $\kappa$ B Überexpression und NF- $\kappa$ B Hemmung in hBMSC Pellets

Zur Prüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Signalweg von NF- $\kappa$ B und der IL-1 $\beta$  Hemmung der Chondrogenese wurden in der vorliegenden Arbeit folgende biologische Methoden benutzt.

Zu diesem Zweck wurde ein optimiertes „biologisches Werkzeug“ gesucht, das in den Signalweg von NF- $\kappa$ B während der Kultivierung der Zellen in der Pelletkultur eingreift. Deshalb wurde ein Adenovirus ausgewählt, der bewährtermaßen den NF- $\kappa$ B Signalweg hemmt. An diesen Adenovirus wurde ein Mutant von I $\kappa$ B, nämlich srI $\kappa$ B, angehängt, in dem die Serine an Platz 32 und 36 mit Alanin (S32A/S36A) ausgetauscht wurden. Das native I $\kappa$ B wird verdrängt und die Phosphorylierung und die daraus folgende Degradierung des transgenen Produktes ist deshalb nicht mehr möglich (Imuro, Nishiura et al. 1998; Jobin, Panja et al. 1998). Die Wirksamkeit eines solchen intrazellulären Inhibitors hängt von einer ausreichenden transgenen Lieferung und Expression des Adenovirus in den Zellen ab.

Die Messung des GAG-Gehalts zeigt, dass dieser bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml IL-1 $\beta$  um die Hälfte reduziert wird (Abbildung 10A). Bei Betrachtung des GAG-Gehalts auf Zellebene pro Zelleinheit wird eine Schwelle sichtbar. Erst ab einer Konzentration von über 0,1 ng/ml IL-1 $\beta$  wird die GAG-Synthese signifikant gehemmt (Abbildung 10B).

Zuerst wurde ein ähnlicher adenoviraler Vektor, der für GFP kodiert (Ad.GFP, grün fluoreszierendes Protein), benutzt, da man seine Leuchtfähigkeit leicht messen kann. Dies sollte uns helfen, die optimale virale Konzentration zur Infizierung der Zellen in der Pelletkultur zu finden. Wie in Abbildung 11 gezeigt, produzierten die drei gewählten Konzentrationen ~60-100% GFP-positive Zellen (äußerer Bereich), von denen ~10-100% stark fluoreszierend waren (innerer Bereich).

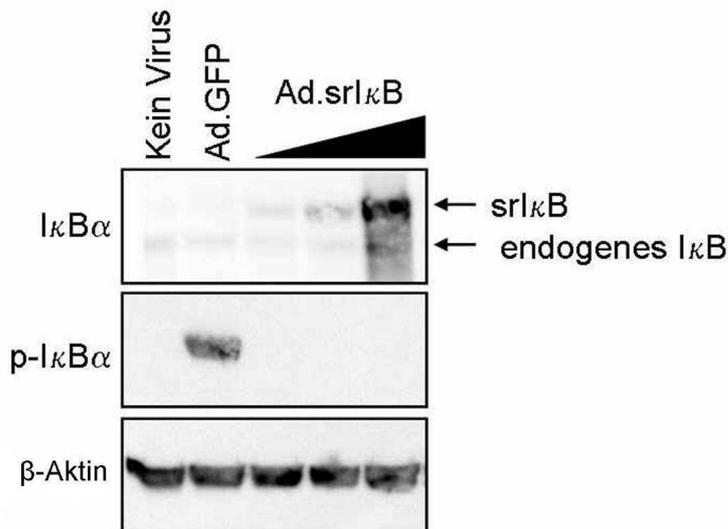


**Abbildung 11**

HBMSC Monolayerkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ad.GFP transduziert, für 6 Tage kultiviert und für die Analyse der GFP Expression durch die Durchflusszytometrie geerntet. Die Streudiagramme (20000 Zellen pro Gruppe) zeigen ihre Fluoreszenzintensität relativ zum Seitwärtsstreulicht. Die Abtrennungslinien zeigen den Anteil von GFP-positiven (äußerer Bereich) sowie stark fluoreszierenden Zellen (innerer Bereich) an.

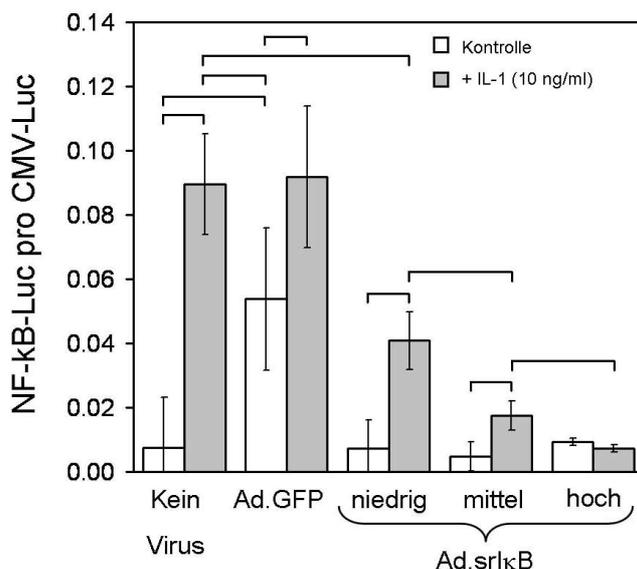
Als Nächstes wurde mit den drei gewählten Konzentrationen die Expression von srI $\kappa$ B in den Zellen des Pelletmodells untersucht. Die Pellets wurden 6 Tage nach der Transduktion mit Ad.srI $\kappa$ B geerntet und für Western Blot-Analysen bearbeitet. Hier konnte bewiesen werden, dass die Expression des Super-Repressors von der Dosis des Virus abhängig ist. Je höher die Dosis, desto stärker konnte die Präsenz des I $\kappa$ B $\alpha$  Antikörpers festgestellt werden. Der dabei entscheidende Mutant srI $\kappa$ B konnte aufgrund seines Hämagglutinin-Anhängers vom endogenen I $\kappa$ B klar unterschieden werden (Abbildung 12).

Eine weitere Beobachtung bestätigt die Wirkung des srI $\kappa$ B. Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B erfolgt durch die Phosphorylierung des I $\kappa$ Bs, was in unserem Fall mit dem Antikörper für Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  im Western Blot durch die alleinige Aktivierung des Adenovirus (Ad.GFP, positive Kontrollgruppe) angezeigt werden konnte. Der positive Beweis verschwindet in der Anwesenheit von Ad.srI $\kappa$ B. Somit ist zu vermuten, dass das Adenovirus selbst eine Rolle im Signalweg des NF- $\kappa$ B spielt.

**Abbildung 12**

hBMSC wurden außer der Kontrollgruppe mit Ad. GFP („hohe“ Konzentration von Ad.srlκB) oder unterschiedlichen Konzentrationen von Ad.srlκB transduziert. Am nächsten Tag wurde diesen Zellen als Pellets im CWM Medium und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die Aggregate mittels Western Blot für die Expression von totalem oder phosphoryliertem I $\kappa$ B untersucht. Das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle. Der srlκB Mutant konnte aufgrund eines zusätzlichen Hämagglutinin-Anhängers vom endogenen Protein unterschieden werden.

Neben diesem qualitativen Nachweis konnte mit der Infizierung durch Ad.NF- $\kappa$ B-Luc auch quantitativ gezeigt werden, dass der Anstieg der NF- $\kappa$ B Aktivität durch die IL-1 $\beta$  Stimulierung dosisabhängig durch Ad.srlκB blockiert werden kann (Abbildung 13).

**Abbildung 13**

Die hBMSC wurden mit Ad.NF- $\kappa$ B-Luc oder Ad.CMV-Luc ( $1 \times 10^4$  Vp/Zelle) infiziert um herauszufinden, ob die Transduktion mit Ad.srlκB zu einer erniedrigten NF- $\kappa$ B Aktivität in den Zellen führt. Am folgenden Tag wurden die Zellen in der jeweiligen Adenovirus-Luciferase Gruppe mit Ad.GFP oder Ad.srlκB zusätzlich transduziert und kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Hälfte der Aggregate mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) im CWM stimuliert. Nach weiteren 5 Stunden wurden die Pellets geerntet und ihre Luciferaseaktivität gemessen. Die Messungen der Ad.NF- $\kappa$ B-Luc Gruppen wurden mit den entsprechenden Ad.CMV-Luc Werten normalisiert. Die Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen ( $n = 6$  Pellets).

Wie schon durch das phosphorylierte I $\kappa$ B im Western Blot angedeutet, bestätigt sich die Vermutung, dass Ad.GFP (mit „hoher Konzentration“) die NF- $\kappa$ B Aktivität ähnlich stark wie IL-1 $\beta$  stimuliert (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass srlκB in der Lage ist, die kombinierte Stimulation von NF- $\kappa$ B durch das Zytokin und die adenovirale Transduktion zu hemmen.

Bisher konnte damit gezeigt werden, dass der von mir benutzte Adenovirus Ad.srlκB in der Lage ist, die Signalwirkung des NF- $\kappa$ B in den hBMSC zu regulieren.

### 3.2 Die Auswirkungen der NF- $\kappa$ B Hemmung auf die Chondrogenese von hBMSC

Eines der Ziele der vorliegenden Studie ist das Verhalten der hBMSC während der Chondrogenese in einem inflammatorischen Milieu mit IL-1 $\beta$  zu untersuchen. Die Vorversuche bestätigen, dass einer der von IL-1 $\beta$  gewählten Aktivierungswege der NF- $\kappa$ B Signalweg ist. Vor diesem Hintergrund wurde den Pelletkulturen aus hBMSC der Ad.srI $\kappa$ B hinzugefügt. Die Vorversuche haben gezeigt, dass sich hier die beiden geringeren Konzentrationen des Ad.srI $\kappa$ B (bezeichnet als „niedrig“ und „mittel“, genauer beschrieben im Methodenteil) für die folgenden Hauptexperimente am ehesten anbieten. Der Ad.GFP als Viruskontrollgruppe wurde jeweils der höheren Konzentration des Ad.srI $\kappa$ B in den einzelnen Versuchen angepasst.

Die Versuchsanordnung wurde in vier Hauptgruppen unterteilt und enthielt chondrogenes Wachstumsmedium (CWM) mit den in Tabelle 3 beschriebenen Zusätzen.

Die Experimente der Gruppe 3 sollten eventuell unerwartete Auswirkungen von IL-1 $\beta$  auf die hBMSC Differenzierung selbst ausschließen. Der einzig beobachtbare Effekt war eine mäßige Stimulierung der Zellteilung.

In jeder Versuchsgruppe wurden folgende vier Differenzierungen vorgenommen: a) Kein Virus (Negativkontrolle), b) Ad.GFP (Viruskontrolle, passend mit „mittlerer“ Konzentration von Ad.srI $\kappa$ B), c) Ad.srI $\kappa$ B („niedrige“ Konzentration) und d) Ad.srI $\kappa$ B („mittlere“ Konzentration).

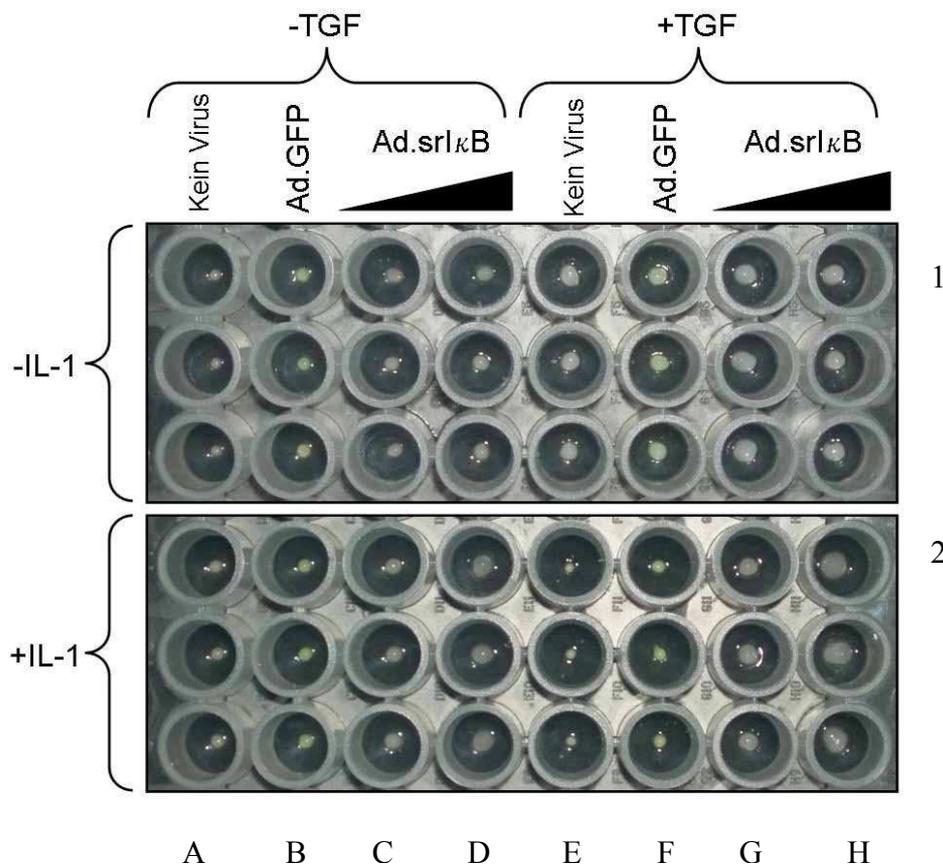
**Tabelle 3:** Gruppeneinteilung der Hauptexperimente

	- TGF- $\beta$ 1	+ TGF- $\beta$ 1
- IL-1 $\beta$	<b>Gruppe 1) negative Kontrollgruppe</b> a) kein Virus      Negativkontrolle b) Ad.GFP          Viruskontrolle c) Ad.srI $\kappa$ B      "niedrige" Konzentration d) Ad.srI $\kappa$ B      "mittlere" Konzentration	<b>Gruppe 2) positive Kontrollgruppe</b> a) kein Virus      Negativkontrolle b) Ad.GFP          Viruskontrolle c) Ad.srI $\kappa$ B      "niedrige" Konzentration d) Ad.srI $\kappa$ B      "mittlere" Konzentration
+ IL-1 $\beta$	<b>Gruppe 3) Nebengruppe</b> a) kein Virus      Negativkontrolle b) Ad.GFP          Viruskontrolle c) Ad.srI $\kappa$ B      "niedrige" Konzentration d) Ad.srI $\kappa$ B      "mittlere" Konzentration	<b>Gruppe 4) Zielgruppe</b> a) kein Virus      Negativkontrolle b) Ad.GFP          Viruskontrolle c) Ad.srI $\kappa$ B      "niedrige" Konzentration d) Ad.srI $\kappa$ B      "mittlere" Konzentration

Da in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass IL-1 $\beta$  über den Signalweg NF- $\kappa$ B funktioniert, wird in den folgenden Versuchen der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die hBMSC Pelletkultur untersucht.

### 3.2.1 Vergrößerung der Pelletgröße

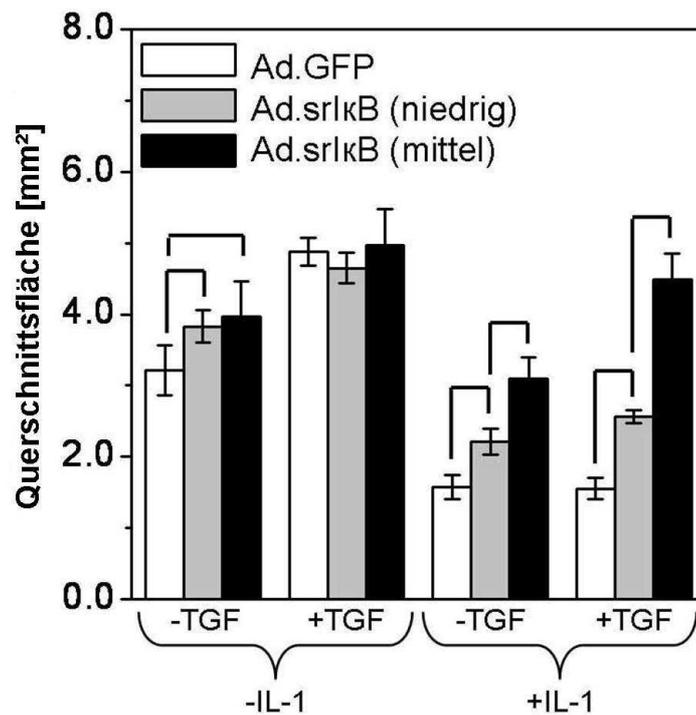
In der Zielgruppe 4 konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der Pellets in Abhängigkeit der Dosierung des Ad.srI $\kappa$ B nach IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 Stimulierung komplett wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 14, 2E-H). Dies ergibt sich aus dem Vergleich des Pelletwachstums mit der positiven Kontrollgruppe 2 (- IL-1, + TGF, Abbildung 14, 1E-H). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Infizierung mit dem Ad.srI $\kappa$ B keinen negativen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung in allen Gruppen hat (siehe Spalten C,D und G,H). Dabei konnte eine interessante Nebenbeobachtung gemacht werden: Das grüne Leuchten der Ad.GFP infizierten Pellets kann makroskopisch entdeckt werden (siehe Spalte B und F). Dies ist eine eindeutige Bestätigung dafür, dass der Adenovirus erfolgreich in die Zellen transduziert wurde.



**Abbildung 14**

Die NF- $\kappa$ B Hemmung führt zur Vergrößerung der IL-1 $\beta$  behandelten Pellets. hBMSC wurden mit Ad.srI $\kappa$ B oder Ad.GFP (identisch mit Ad.srI $\kappa$ B) transduziert. Diese Gruppen wurden als Pellet mit oder ohne TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) und / oder IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 6 Wochen kultiviert. Die Abbildung zeigt Triplikate der Pellets der einzelnen Behandlungsgruppen.

Interessanterweise verzeichneten die Pellets bei der quantitativen Messung ihrer Querschnittsfläche einen signifikanten Größenzuwachs (Abbildung 15). Sogar in der Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 konnten statistisch signifikante Unterschiede unabhängig von der Anwesenheit von IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Allerdings variierten hier die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Patienten (Daten nicht gezeigt) und die Zellen zeigten eher eine zelluläre als chondrogene Antwort, indem der DNA-Gehalt der Pellets stieg.



**Abbildung 15**

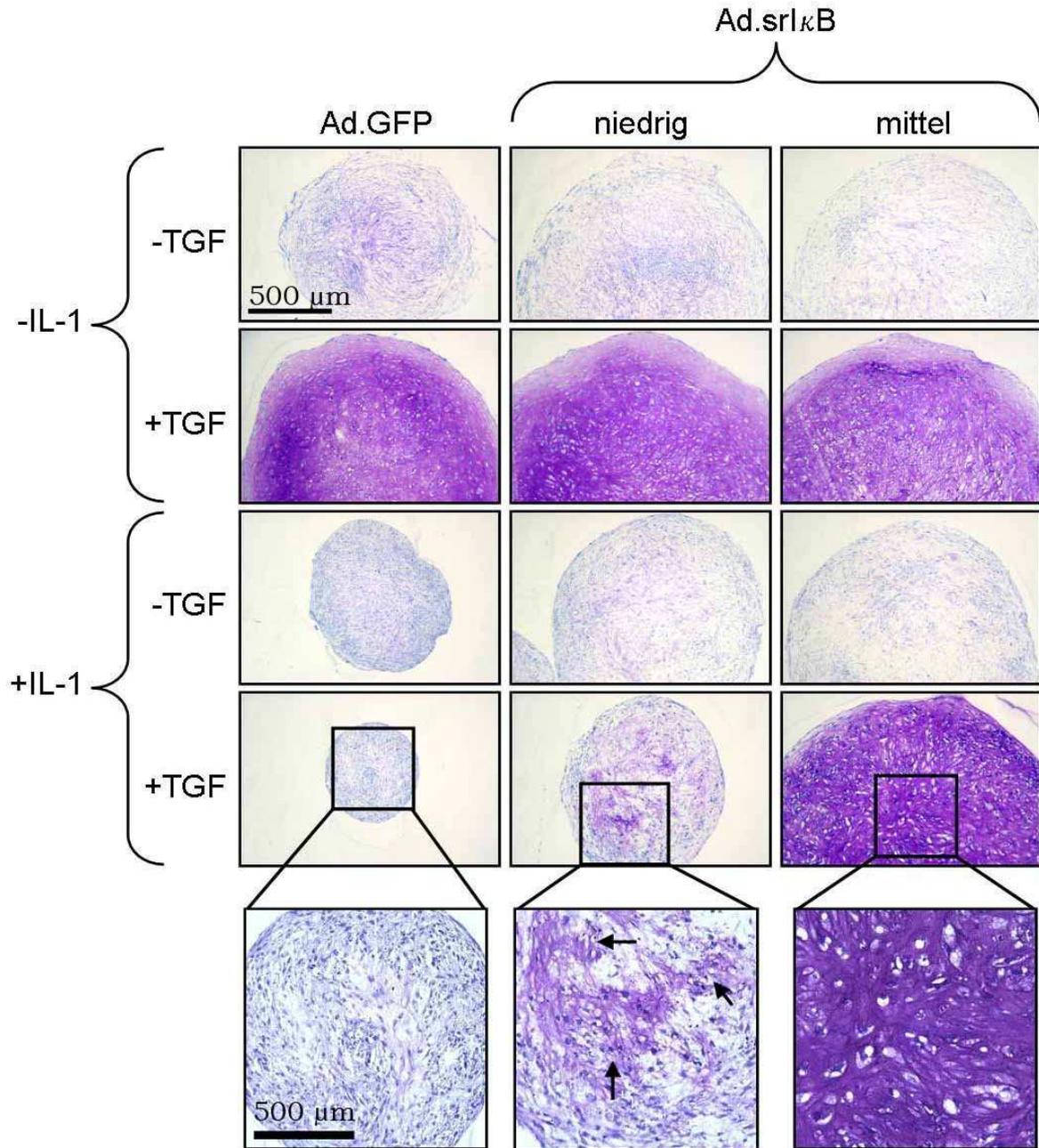
Die quantitative Analyse des Durchmessers dieser Pellets erfolgte mit der Image J Software. Die Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen ( $n=5$  Pellets).

### 3.2.2 Der Einfluss des srIkB Gentransfers auf die Chondrogenese der hBMSC bei IL-1 $\beta$ Anwesenheit

Die Anwesenheit von IL-1 $\beta$  im TGF $\beta$ -1 angereicherten Medium führt, wie in den Vorversuchen gezeigt, grundsätzlich zu einer Hemmung der Chondrogenese der hBMSC. Nachdem durch die Ad.srlkB Infizierung ein positiver Effekt auf das Wachstum der IL-1 $\beta$  behandelten Pellets gezeigt werden konnte, wurden sie weiter qualitativ und quantitativ untersucht.

Mit der Applikation des Ad.srlkB konnte die erfolgreiche, dosisabhängige Redifferenzierung der hBMSC zu Chondrozyten mittels der Toluidinblaufärbung nachgewiesen werden (Abbildung 16). Bemerkenswert ist, dass sogar isolierte Bereiche innerhalb der IL-1 $\beta$  behandelten Pellets positiv für GAG färbten, wenn sie nur mit der „niedrigen“ Konzentration des Ad.srlkB transduziert wurden. Aus den Vorversuchen mit der Durchflusszytometrie lässt

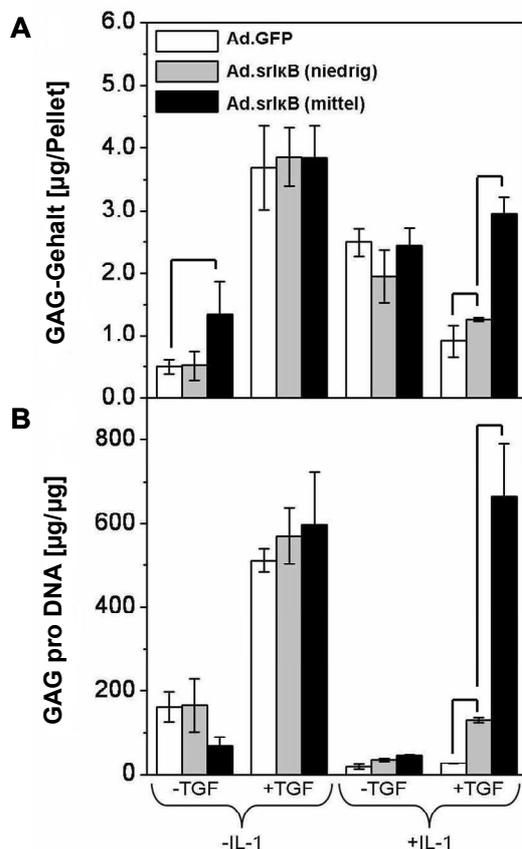
sich ableiten, dass nur ca. 30% der Zellen infiziert worden sind. Dies lässt vermuten, dass die Zellen in den infizierten Regionen das srI $\kappa$ B-Gen erhalten haben, während bei den Nachbarzellen, nämlich denen ohne positive Toludinblaufärbung, keine Transduktion erfolgt ist.



**Abbildung 16**

Die NF- $\kappa$ B Hemmung stellt das chondrogene Differenzierungspotential der IL-1 $\beta$  behandelten hBMSC wieder her. Die Aggregate wurden histologisch vorbehandelt, geschnitten und mit Toludinblau gefärbt. Vergrößerte Ausschnitte: Die „+IL-1, +TGF, Niedrigdosis Ad.srl $\kappa$ B“ – Gruppe zeigt einzelne Regionen, die positiv für die Proteoglykansynthese angefärbt wurden (Pfeile).

Die Ad.srIkB-dosisabhängige Zunahme des Proteoglykangehalts in der Zielgruppe 4 (+ IL-1, + TGF) konnte durch quantitative Analysen bestätigt werden (Abbildung 17B). Für die Behandlungsgruppe der „mittleren“ Ad.srIkB Konzentration (hier jedoch die höhere Dosis der beiden verwendeten Konzentrationen) konnte kein signifikanter Unterschied zur positiven Kontrollgruppe (+ TGF, -IL-1) für den Fall der Anwesenheit von IL-1 $\beta$  festgestellt werden. Somit fand die Resynthese des GAGs erfolgreich statt. Hier wird deutlich, dass bei der Synthese von Proteoglykan IL-1 $\beta$  keine Rolle spielt. Maßgeblichen Einfluss auf den GAG Gehalt hat jedoch TGF- $\beta$ 1, da sich die hBMSC nach Ad.srIkB Infizierung wie in der positiven Kontrollgruppe (+TGF, - IL-1) verhalten. Bei Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 steigt der GAG-Gehalt von ca. 50  $\mu$ g/ $\mu$ g DNA auf das 12-fache, nämlich 600  $\mu$ g/ $\mu$ g DNA.



In der Zielgruppe 4 (+IL-1, +TGF) stieg der GAG-Gehalt mit zunehmender Expression des Ad.srIkB an (Abbildung 17A). Diese Beobachtung erklärt möglicherweise die entsprechenden Unterschiede im Durchmesser der Zellaggregate. Zwischen der Kontroll- und der Ad.GFP Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Damit bestätigen die Toludinblaufärbungen und GAG-Werte, dass ein IL-1 $\beta$  induzierte Hemmung der Chondrogenese von hBMSC durch Ad.srIkB neutralisiert und damit positiv beeinflusst werden konnte.

**Abbildung 17**

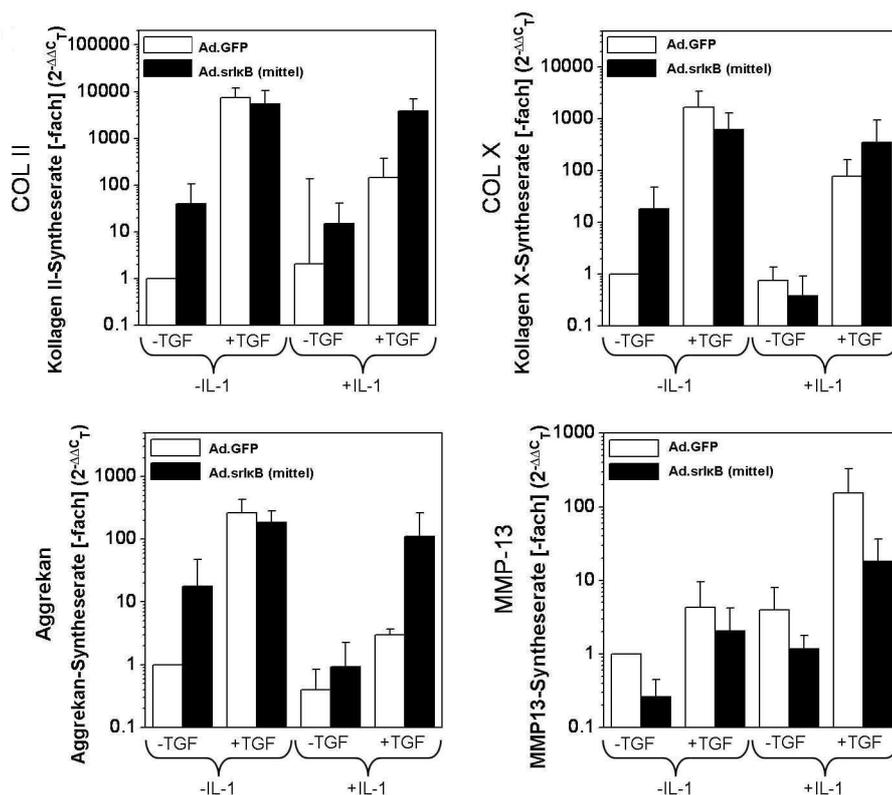
Zeitgleich wurden die Pellets über Nacht verdaut und ihr jeweiliger GAG und DNA Gehalt analysiert. Die Klammern zeigen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen ( $n=3$  Pellets).

**A.** GAG-Gehalt pro Pellet.

**B.** Der GAG-Gehalt wurde mit dem DNA-Gehalt des jeweiligen Pellet normalisiert.

### 3.2.3 Resynthese chondrogener Marker

Die Ad.srI $\kappa$ B Infizierung der Zellen führt zu einer Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges. Nun kann eine erfolgreiche Chondrogenese der hBMSC trotz der Anwesenheit von IL-1 $\beta$  *in vitro* stattfinden. Dieser positive Effekt des srI $\kappa$ B wird zusätzlich auf molekularer Ebene untersucht. Quantitative RT-PCR für Kollagen Typ II (COL II) und das Aggrekan Kernprotein (ACP) der 6 Wochen alten Ad.GFP-Zellaggregate (Abbildung 18) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den IL-1 $\beta$  negativen und IL-1 $\beta$  positiven Versuchsgruppen. Jedoch verschwand dieser Unterschied bei Ad.srI $\kappa$ B Infizierung. Die Expressionslevel von COL II und ACP waren trotz der Zugabe von IL-1 $\beta$  in das Medium ähnlich hoch. In den Gruppen 1 und 3 (beide ohne TGF) war die Expression der beiden chondrogenen Marker nach 6-wöchiger Kultivierung kaum messbar. Kollagen Typ X (COL X) folgte dem Trend von COL II, was typisch für dieses *in vitro* Zellkulturmodell ist (Pelttari, Winter et al. 2006) (Abbildung 18).



**Abbildung 18**

Die NF- $\kappa$ B Hemmung stellt die Synthese von chondrogenen Markern innerhalb der IL-1 $\beta$  behandelten Pellets wieder her. hBMSC wurden mit Ad.srI $\kappa$ B oder Ad.GFP („mittlere“ Konzentration von Ad.srI $\kappa$ B) transduziert. Diese Gruppen wurden als Pellet mit oder ohne TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) und / oder IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 6 Wochen kultiviert. Messenger RNA wurde von gepoolten Aggregaten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die daraus resultierende DNA wurde auf die Expression von Kollagen Typ II (COL II; oben links), Kollagen Typ X (COL X; oben rechts), Aggrekan Kernprotein (ACP; unten links), Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13, unten rechts) und GAPDH hin untersucht. Die Schwellenwerte der Zyklen ( $C_T$ ) wurden für jede Gruppe bestimmt und die ungefähren Vielfachwerte (relativ zu „-IL-1, -TGF, Ad.GFP“-Pellets) wurden mit der  $\Delta\Delta C_T$  Methode berechnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten werden gezeigt.

Der Abbau von Kollagen II erfolgt durch proteolytische Enzyme wie z.B. die Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13), die u.a. durch IL-1 $\beta$  stimuliert werden (Haberhauer 2003). Die Expression dieses Markers, der eine Aussage über den Abbau im Knorpelstoffwechsel und den hypertrophen Charakter des Chondrozyten macht (Richter 2007), war nur in der kombinierten Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$  hochreguliert. Beim Ersatz von Ad.GFP durch Ad.srI $\kappa$ B in dieser Behandlungskombination (Gruppe 4: + TGF, + IL-1) reduzierte sich die Expression von MMP-13 auf ein Zehntel (Abbildung 18), was für eine erfolgreiche Hemmung des IL-1 $\beta$  aktivierten NF- $\kappa$ B Signalweges spricht.

Die Variabilität zwischen den Syntheseratenmessungen ist relativ groß, weil die mRNA aus gepoolten Pellets innerhalb des Experiments stammt und der Vergleich der Expressionsniveaus zwischen verschiedenen Patientenpopulationen stattgefunden hat. Dennoch konnten signifikante Unterschiede durch den Vergleich der  $\Delta C_T$  Werte statistisch ( $p < 0,05$ ) zwischen Gruppe 2 (+ TGF, - IL-1) und 4 (+ TGF, + IL-1) in der Anwesenheit von Ad.GFP gefunden werden (Tabelle 4). Positiv kann vermerkt werden, dass durch die Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen verschwanden.

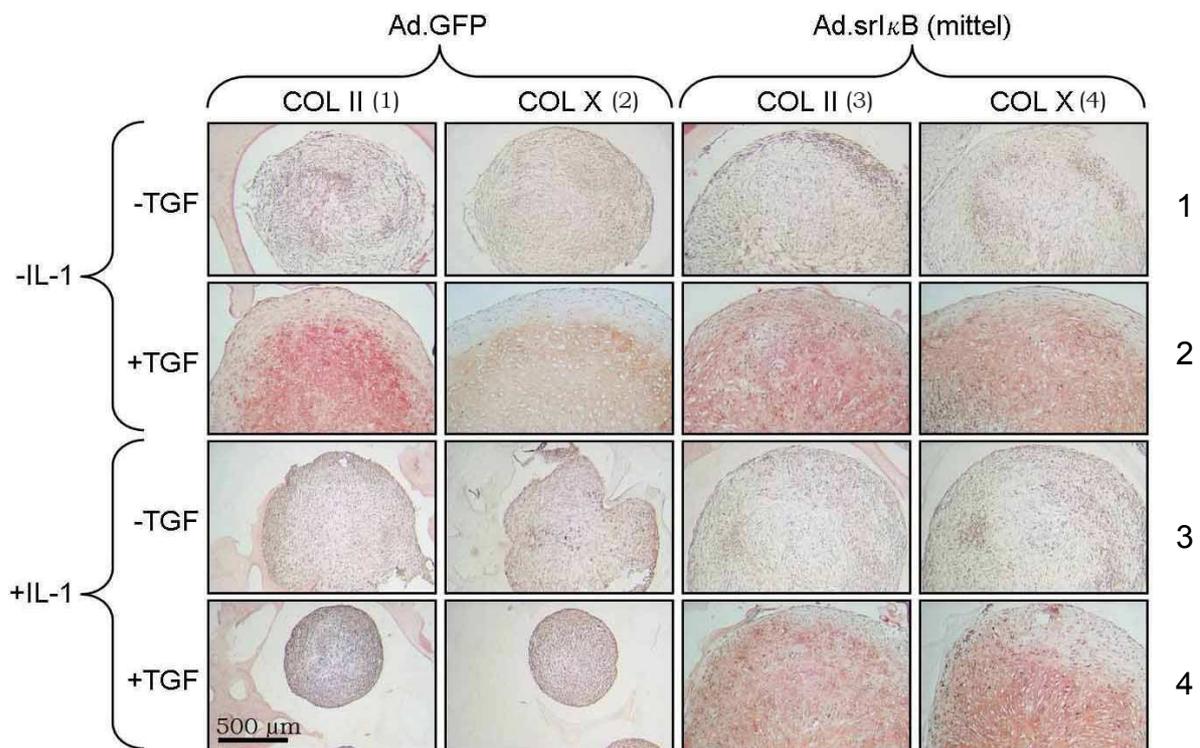
**Tabelle 4:**  $\Delta C_T$  Werte der qRT-PCR. Die  $\Delta C_T$  Werte sind als Mittelwerte (mit Standardabweichung) angegeben.

$\Delta C_T$  Werte ( $C_T[\text{Zielgen}] - C_T[\text{GAPDH}]$ )

Vektor	Gruppe	ACP	COL II	COL X	MMP-13
Ad.GFP	-IL-1, -TGF	7.9 (1.5)	11.2 (0.2)	9.2 (3.2)	3.9 (3.6)
Ad.GFP	-IL-1, +TGF	0.1 (0.3)	-1.5 (0.80)	-0.5 (1.0)	2.8 (1.4)
Ad.GFP	+IL-1, -TGF	10.0 (3.5)	10.3 (4.1)	10.1 (3.9)	2.4 (2.5)
Ad.GFP	+IL-1, +TGF	6.3 (1.8)	5.7 (2.7)	4.3 (0.6)	-2.7 (2.4)
Ad.srI $\kappa$ B	-IL-1, -TGF	7.0 (3.2)	9.3 (4.2)	7.8 (2.4)	6.1 (3.2)
Ad.srI $\kappa$ B	-IL-1, +TGF	0.6 (0.8)	-0.7 (1.7)	0.5 (2.5)	3.6 (1.6)
Ad.srI $\kappa$ B	+IL-1, -TGF	9.7 (3.7)	11.7 (5.3)	12.8 (5.6)	3.8 (3.7)
Ad.srI $\kappa$ B	+IL-1, +TGF	2.2 (2.3)	0.8 (3.8)	3.9 (4.4)	0.3 (4.7)
p-Werte (Studentscher t-Test)					
Ad.GFP	+TGF, -IL-1 vs. +IL-1	<b>0.004</b>	<b>0.012</b>	<b>0.002</b>	<b>0.024</b>
Ad.srI $\kappa$ B	+TGF, -IL-1 vs. +IL-1	0.315	0.561	0.311	0.303

### 3.2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Weiter konnten die immunhistochemischen Färbungen für Kollagen II (COL II) und Kollagen X (COL X) die Beobachtungen auf Proteinebene belegen (Abbildung 19, Reihe 2). In der Anwesenheit von IL-1 $\beta$  gab es keine positive Färbung für COL II und COL X (Spalte 1 und 2, Reihe 4). Sobald die Zellen aber mit Ad.srl $\kappa$ B transduziert wurden, konnten sich die hBMSC in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  wieder chondrogen differenzieren und bildeten COL II und COL X (Spalte 3 und 4, Reihe 4).



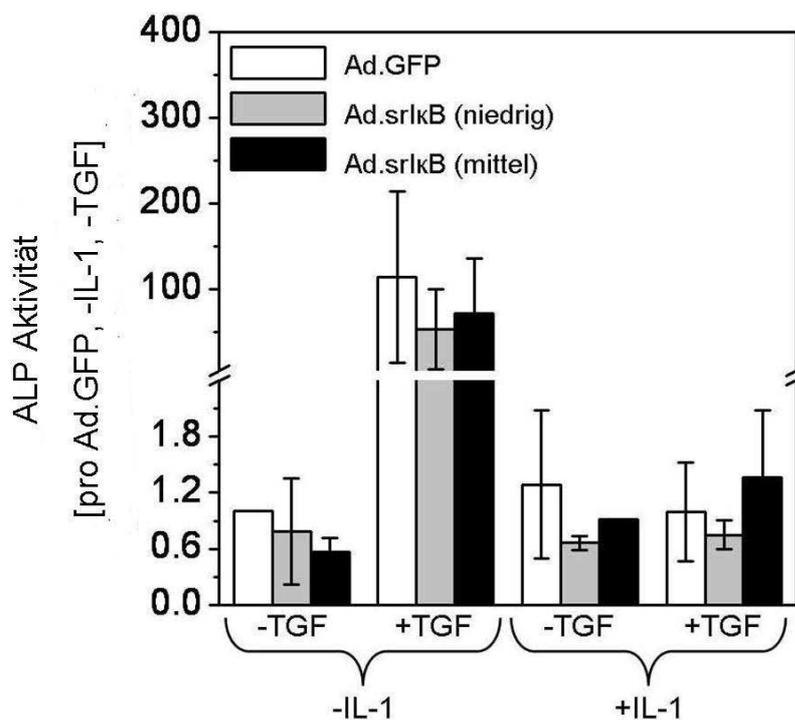
**Abbildung 19**

Die Immunhistochemie konnte den positiven Einfluss der NF- $\kappa$ B Hemmung auf chondrogene Marker bestätigen. Die in Abbildung 6 gezeigten Pellets wurden zusätzlich für COL II (Spalte 1 und 3) und COL X (Spalte 2 und 4) immunhistochemisch angefärbt. Die Nuklei wurden mit Hämatoxylinblau gegengefärbt.

### 3.3 Die alkalische Phosphataseaktivität als Marker der enchondralen Ossifikation

Abschließend wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen, um die Qualität der terminalen Differenzierung auf der chondrogenen Linie der hBMSC besser beurteilen zu können. Ein Chondrozyt kann sich in der Endphase in einen hypertrophen Chondrozyten (siehe Abbildung 2 in der Einleitung) und anschließend in einen Osteoblasten differenzieren (Aubin 1998). Dieser Schritt der Enddifferenzierung verfehlt jedoch das eigentliche Ziel, nämlich die Bildung eines hyalinen Knorpels. Hier geht es also um die Frage, ob die Chondrogenese in der Zielgruppe zu einem qualitativ guten Ergebnis führt.

Eine erhöhte alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität ist ein Indikator für die osteoblastäre und hypertrophe Differenzierung der MSC, aber auch für die enchondrale Ossifikation (Richter 2007). Im Experiment war die ALP-Aktivität der Zellysate durch die TGF-Stimulierung in Gruppe 2 (positive Kontrollgruppe: + TGF, -IL-1) um das 100-fache erhöht. Dieser Effekt konnte in Zielgruppe 4 jedoch nicht nachgewiesen werden. Vielmehr blieb die ALP-Aktivität, selbst nach Ad.srI $\kappa$ B Infizierung, auf dem Niveau der negativen Kontrollgruppe (Abbildung 20). Dieses unerwartete Ergebnis zeigt, dass die ALP-Aktivität nicht dem Trend der chondrogenen Marker wie z.B. COL II folgt.



**Abbildung 20**

Die alkalische Phosphataseaktivität bestätigt nicht den Trend der chondrogenen Marker. hBMSC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ad.srI $\kappa$ B oder Ad.GFP („hohe“ Konzentration von Ad.srI $\kappa$ B) transduziert. Die einzelnen Gruppen wurden als Pellets mit oder ohne TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) und / oder IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) für 6 Wochen kultiviert. Nach 6 Wochen wurden die Aggregate gepoolt und lysiert. Die alkalische Phosphataseaktivität innerhalb des löslichen Proteinanteils wurde mittels der Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat bestimmt und mit dem gesamten Proteingehalt normalisiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen zwei unabhängige Experimente.

## 4 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zu den Auswirkungen von IL-1 $\beta$  auf die Differenzierung von hBMSC zu Chondrozyten sollten helfen, den Mechanismus der Chondrogenese *in vitro* zu verstehen. Während in den Gruppen ohne den kombinierten Zusatz von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 keine erheblichen Veränderungen durch die Infizierung mit dem Ad.srIkB zu finden waren, konnte Zielgruppe 4 (+ TGF- $\beta$ 1, + IL-1 $\beta$ ) die zugrunde liegende These, dass proinflammatorische Zytokine die Chondrogenese aus hBMSC NF- $\kappa$ B abhängig hemmen, untermauern. Die Transduktion der Zellen mit dem Ad.srIkB hatte einen nachweisbaren positiven Effekt auf die chondrogene Differenzierung von hBMSC, die in der Anwesenheit von IL-1 $\beta$  wachsen. Sie machen deutlich, dass IL-1 $\beta$  die Differenzierung der hBMSC beeinflusst und dass dieser Einfluss NF- $\kappa$ B abhängig ist. Damit spielt NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Regulierung des IL-1 $\beta$  Signalweges bei der chondrogenen Differenzierung der hBMSC. Diese Beobachtungen könnten auch darauf hinweisen, dass eine erfolgreiche NF- $\kappa$ B Hemmung durch Ad.srIkB zu einer Reduzierung der hypertrophen Entwicklung innerhalb des Knorpels, der sich aus Knorpelvorläuferzellen differenziert, führen könnte. Hier müssen jedoch weitere *in vivo*-Versuche gemacht werden, um diesen Mechanismus vollständig zu verstehen.

### 4.1 Kultivierung der hBMSC

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine umfassende Untersuchung der Auswirkungen von IL-1 $\beta$  auf das chondrogene Differenzierungspotential von hBMSC durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde ein standardisiertes und einfaches *in vitro* Modell, die Pelletkultur, gewählt. Kosten- Material- und Zeitersparnisse spielten eine Rolle in der Entscheidung für die wenig verbreitete „96-Mikrotiterplatten“-Methode. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die Nachahmung möglichst natürlicher Bedingungen durch die 3D-Kultivierung. Des Weiteren wird der Differenzierungszustand der Zellen durch die Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 stabilisiert. Bei der physiologischen Chondrogenese (Richter 2005) wird nach einer Supprimierung der Kollagen-Typ-I Expression verstärkt Kollagen-Typ-II gebildet. Auf diesem Differenzierungsniveau bleiben artikuläre Chondrozyten stabil, während in der *in vitro* Chondrogenese die Expression von Kollagen-Typ-X, einem Marker für die Hypertrophie sowie von MMP-13, einem Marker der terminalen Differenzierung, im Rahmen der enchondralen Ossifikation ansteigt (Abbildung 2 in der Einleitung).

Die unerwünschte *in vitro* Hypertrophie der Chondrozyten konnte in dieser Studie nicht komplett beseitigt werden. Die Analysen der Pellets haben positiv für Kollagen-Typ-X angezeigt, jedoch war es durch die Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges möglich, die Expression der terminalen Differenzierungsmarker (ALP und MMP-13) zu unterdrücken. Außerdem belegen die metachromatische Färbung und die Produktion von Kollagen-Typ-II und Aggrecan eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass das Genexpressionsmuster der gezüchteten Pellets zunehmend mehr dem gesunden als dem osteoarthrotischen, hypertrophen Gelenkknorpel ähneln könnte.

Der Vorteil der 3D-Kultur wurde teilweise durch die unzureichende Nachahmung der komplexen Umgebungsbedingungen wie die biomechanische Belastung beim menschlichen Knorpeldefekt aufgehoben. Jedoch findet man dieses Problem bei den meisten *in vitro* Modellen. Dieser Nachteil sollte durch die humanen MSC wieder ausgeglichen werden, um möglichst klinisch relevante Ergebnisse zu erhalten. Die hBMSC eigneten sich sehr gut, die gewünschten Analysen durchzuführen und die experimentellen Fragen in diesem Zellmodell zu beantworten.

## 4.2 Vergleich der Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur

Die Literatur bestätigt die Vorversuchsergebnisse, dass rekombinantes TGF- $\beta$ 1 das Wachstum der Pellets erfolgreich stimuliert (Palmer, Steinert et al. 2005). Außerdem sind in der Literatur zwei weitere Veröffentlichungen zu den *in vitro* Versuchen zu finden, die mit unseren Schlussfolgerungen übereinstimmen. Die erste von beiden (Haupt, Frisbie et al. 2005) zeigt, dass IL-1Ra die Fähigkeit von IGF-1 fördert, die Pferdeknorpelmatrix zu regenerieren. Die zweite Publikation von McNulty et al (McNulty, Moutos et al. 2007) greift diesen Ansatz ebenfalls auf. Die vorliegenden Daten sind außerdem mit denen von der Untersuchung zur osteogenen und adipogenen Differenzierung von Li et al (Li and Makarov 2006) übereinstimmend, auch wenn sie arthritischen Fibroblasten ähnliche Synoviozyten verwendeten. Dennoch zeigt sich, dass die Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges die Differenzierung multipler Zelllinien verbessert und nicht zellspezifisch ist.

## 4.3 Auswirkungen von Entzündungsmediatoren

Das Milieu entzündlicher Gelenke bietet grundsätzlich schlechte Bedingungen für zellbasierte Reparaturen von Knorpelverletzungen. Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sind im Falle einer Verletzung oder Erkrankung des Gelenks sehr wahrscheinlich bei der Knorpelregeneration präsent. Es ist schon lange bekannt, dass IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Zerstörung extrazellulärer

Matrix im Gelenkknorpel fördern, während sie die Synthese der Knorpelmatrix hemmen (Tyler 1985; Saklatvala 1986). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass diese Zytokine auch die chondrogene Differenzierung von hBMSC hemmen. Diese Gesamtanalyse zeigt die enormen biologischen Herausforderungen bei der Knorpelregeneration im menschlichen Gelenk. Sie erklärt möglicherweise auch, warum die bisher angewandten Behandlungsmethoden nicht in der Lage sind, ein erfolgreiches, zuverlässiges und lang anhaltendes klinisches Ergebnis zu bieten.

Zu den komplexen *in vivo* Verhältnissen im Gelenk kommen Entzündungstimulatoren wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  hinzu, deren Konzentration in der Synovialflüssigkeit bei Arthrose oder rheumatischer Arthritis erhöht sind (Fontana, Hengartner et al. 1982; Miossec, Dinarello et al. 1986; Husby and Williams 1988; Yocum, Esparza et al. 1989). Diese Zytokine sind potente Hemmer des Chondrozytenphänotyps (Goldring, Birkhead et al. 1988; Lefebvre, Peeters-Joris et al. 1990; Bolton, Dudhia et al. 1996; Lum, Hakala et al. 1996) und könnten für die schlechte Selbstheilung des Knorpels verantwortlich sein (Fontana, Hengartner et al. 1982; Miossec, Dinarello et al. 1986; Yocum, Allen et al. 1986).

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen es, die Daten von McNulty et al (McNulty, Moutos et al. 2007) zu bestätigen. Er beschreibt, dass die Hemmung von Zytokinen durch IL-Ra oder Antikörper gegen TNF- $\alpha$  neue integrative Therapien ermöglicht und schlägt dies als potentielle Strategie vor, so die Differenzierung von hBMSC zu Chondrozyten in einem entzündeten Mikromilieu in einem verletzten Gelenk zu verbessern.

Die Ergebnisse beziehen den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei Hemmung der Chondrogenese durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den Mechanismus mit ein. Dies stimmt mit der Fähigkeit von NF- $\kappa$ B überein, die Expression von Sox-9 (Sitcheran, Cogswell et al. 2003), von TGF- $\beta$  Rezeptor II (Bauge, Legendre et al. 2007) und die Phosphorylierung von Smad 3/4 als Antwort auf TGF- $\beta$  hemmen zu können (Roman-Blas, Stokes et al. 2007). Die Smad Familie ist eine Gruppe von Proteinen, die zur Gruppe der TGF- $\beta$  Modulatoren gehören. Normalerweise wird Smad 3 durch den TGF- $\beta$  Rezeptor I phosphoryliert, komplexiert sich dann mit Smad 4 und ermöglicht somit die Transduktion des Signals in den Nukleus. Im Gegensatz dazu hemmt Smad 7 die Transduktion innerhalb des TGF- $\beta$  Signalweges. Diese Aktivität kann NF- $\kappa$ B fördern (Bauge, Legendre et al. 2007; Bauge, Attia et al. 2008).

Die bisherigen Beobachtungen legen verschiedene mögliche Strategien zur Verbesserung des klinischen Ergebnisses des Knorpelersatzes nahe. Auf der einen Seite kann ein Ziel sein, die Aktivität von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Gelenkspalt zu hemmen; auf der anderen Seite kann die Blockierung der NF- $\kappa$ B Aktivität in den Chondrozyten oder ihren Vorläuferzellen im Fokus stehen. Diese zwei Ansätze schließen sich gegenseitig grundsätzlich nicht aus. Strategien für

eine Knorpelreparatur in einer entzündlichen Umgebung sollten deshalb den Gebrauch von spezifischen Gegenspielern individueller Pyrogene wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  einschließen und/oder auf intrazelluläre Mediatoren wie NF- $\kappa$ B abzielen.

#### 4.4 Vorhandene Therapien in der Klinik

Heutzutage gibt es bereits klinische Therapien zur Behandlung von rheumatischer Arthritis und anderen entzündlichen Erkrankungen, die Antagonisten gegen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  einsetzen. Sie umfassen den IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra, Anakinra) (Gabay 2000), Antikörper direkt gegen TNF- $\alpha$  (Infliximab, Adalimumab) und bivalente, lösliche TNF-Rezeptor-IgG (Etanercept) (Toussiot and Wendling 2007). Obwohl diese Medikamente zur Behandlung der rheumatischen Arthritis systemisch eingesetzt werden, eignen sich diese Mittel auch für die intraartikuläre Injektion in das betroffene Gelenk. Bei lokaler Applikation dagegen lassen sich Nebenwirkungen und Kosten vermeiden, die mit der systemischen Applikation zusammenhängen können.

Allerdings gibt es bei rekombinanten Proteinen, die zum Einsatz bei chronischen Behandlungen kommen, ein Problem: Die Halbwertszeit der rekombinanten Proteine im Gelenk ist wegen ihrer fehlenden Glykolysierung wahrscheinlich zu kurz, um die Knorpelregeneration erfolgreich stimulieren zu können. Eine Alternative hierzu, die diese Limitierung umgehen kann, ist die Gentherapie. Der Gentransfer, sei es in der Synovialflüssigkeit (Evans, Ghivizzani et al. 2006) oder *ex vivo*, direkt in den Chondrozyten (Kang, Marui et al. 1997) oder Knorpelvorläuferzellen (Palmer, Steinert et al. 2005), bietet als alternative Technologie einen attraktiven Ansatz. Die Realisierbarkeit und Sicherheit dieses Ansatzes hat die Gruppe von Evans et al (Evans, Robbins et al. 2005) mit dem Transfer von IL-1Ra cDNA in die Synovialflüssigkeit des humanen Gelenks gezeigt.

Haupt et al (Haupt, Frisbie et al. 2005) hat den schützenden Effekt des IL-1Ra cDNA in Synovialzellen in einem *in vitro* Pferdeknoorpeldegenerationsmodell gezeigt. IL-1Ra hat ein molekulares Gewicht von 20-25 kDa, je nach Grad der Glykolysierung. Damit ist IL-1Ra klein genug, um in den Knorpel oder an die Stelle der Knorpelregeneration frei zu diffundieren, wenn es vom Synovium produziert wird (Arend 2003). Die Antikörper-basierten Medikamente wie Infliximab, Etanercept und Adalimumab sind möglicherweise zu groß, um frei diffundieren zu können. Andere, eher generell antiinflammatorische Therapien, wie zum Beispiel das zellfreie „Autologe Conditionierte Serum“ (Wehling, Moser et al. 2007), sind in diesem Kontext zu bevorzugen, wenngleich hohe Dosen von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) (Brandt 1987; Rehman, Bertera et al. 2003) und Steroiden (Celeste, Ionescu et al. 2005) kontraindiziert sind, da sie die Synthese von Knorpelmatrix hemmen.

#### 4.5 NF- $\kappa$ B als alternativer Ansatz

Wie bereits beschrieben, kann der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B einen alternativen Ansatz zur Knorpelregeneration bieten. Eine Anzahl von verschiedenen Entzündungsmediatoren aktiviert ihn. Somit bietet die NF- $\kappa$ B Hemmung möglicherweise einen effektiveren Ansatz zur Regeneration des Gelenkknorpels als die bloße Blockierung einzelner Zytokine.

Die intrazelluläre Lokalisierung des NF- $\kappa$ B beschränkt allerdings die Auswahl der Inhibitoren. Der Gentransfer bietet eine Möglichkeit, *ex vivo* Strategien bei der Knorpelregeneration zu nutzen. Die Effektivität dieses Gentransferansatzes konnte mit einem adenoviralen Konstrukt in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden.

Alternativ gibt es Oligonukleotiddecoyantagonisten (Miagkov, Kovalenko et al. 1998) oder Peptidantagonisten gegen NF- $\kappa$ B, die Domänen für Peptidtransduktionen besitzen (Rehman, Bertera et al. 2003). Interessanterweise zeigen Neutraceuticals Glucosamine, die üblicherweise zur Behandlung der Arthrose eingesetzt werden, Aktivitäten gegen NF- $\kappa$ B (Gouze, Bianchi et al. 2002). Sie fördern auch die Matrixproduktion in Chondrozyten (Derfoul, Miyoshi et al. 2007).

Hinzu kommt, dass NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort spielt, also sollte die Hemmung dieses Transkriptionsfaktors auf den Knorpelersatz ortsgebunden fokussiert werden. Eine weitere Eigenschaft des Faktors ist die Stimulierung der Knochenerosion, die mit der Arthritis assoziiert ist und durch eine Langzeithemmung mit dem adenoviralen Konstrukt verhindert werden könnte. Dieser Vorteil wird jedoch durch die höhere Empfindlichkeit des Gelenks für bakterielle Infektionen während der Therapie wieder aufgehoben. Auch wenn die genauen Ausprägungen des NF- $\kappa$ B Effektes noch erforscht werden müssen, sorgt seine Regulierung für ein Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Apoptose. Dieser Zusammenhang ist bei der Entwicklung effektiver, biologischer Therapien zur verbesserten Behandlung der Arthrose wichtig. Klinisch wäre nämlich wünschenswert, einen spezifischen NF- $\kappa$ B Inhibitor mit kurzer Behandlungszeit zu entwickeln, der einen maximalen therapeutischen Effekt mit minimalen Nebenwirkungen hat.

#### 4.6 Vor- und Nachteile des adenoviralen Gentransfers

In der vorliegenden Studie wurde die Hemmung der NF- $\kappa$ B Aktivität mit einer relativ neuen Methode, dem adenoviralen Gentransfer mit einem I $\kappa$ B Superrepressor, untersucht. Der Adenovirus funktionierte in den Versuchen als „biologisches Werkzeug“. Langfristig ist das Ziel jedoch, einen klinischen Einsatz der Genthherapie in Betracht zu ziehen. Eine theoretische Barriere zur *in vivo* Nutzung der viralen Vektoren sind die potentiellen Immunreaktionen, die

massiv sein können (Bangari and Mittal 2006). Ein weiteres Problem sind die lokalen Entzündungsreaktionen, die auch in den *in vitro* Ergebnissen der Ad.GFP Versuchsgruppe bestätigt wurden. Das Ziel, weniger immunologische Reaktion und doch ausreichend effektive Transduktionsergebnisse zu bekommen, kann mit der Benutzung von Lanthan erreicht werden (Palmer, Stoddart et al. 2008). Diese Methode ermöglichte auch in der vorliegenden Arbeit eine verbesserte Transduktion selbst bei niedrigen Konzentrationen und provoziert somit körpereigene Immunreaktionen in einem geringeren Ausmaß. Die lokale und zellspezifische Applikation der NF- $\kappa$ B Inhibitoren sollte mögliche Nebenwirkungen, die mit der systemischen Belastung bedingt sind, aufheben und das Risiko einer allgemeinen Immunsuppression minimieren. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist proinflammatorisch und antiapoptotisch. Seine Hemmung durch Ad.srI $\kappa$ B hat möglicherweise noch weitere Folgen auf die Zellmodulation. Normalerweise begehen alte Zellen den programmierten Zelltod, die so genannte Apoptose. Jedoch würden diese Zellen durch das antiapoptotische NF- $\kappa$ B Signal, das bei chronischen Entzündungen konstant aktiviert ist, überleben und somit die Entwicklung von Hyperplasien und präkanzerogenen Läsionen (Delhalle, Blasius et al. 2004) ermöglichen. Die Hemmung von NF- $\kappa$ B hat also noch mehr therapeutische Vorteile, indem es präkanzerogene Läsionen verhindert, Entzündungen und die Entwicklung von Hyperplasien hemmt.

#### 4.7 Autologe Stammzelltherapie bei chronischen Knorpelschäden?

Bezüglich der klinischen Applikationsmöglichkeiten und der therapeutischen Ausnutzung der hBMSC zur Knorpelregeneration müssen ihre Vorteile den potenziellen Gefahren gegenüber gestellt werden. Die zu Beginn erwähnten Vorteile lassen sich wie folgt zusammenfassen: Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch eine hohe Regenerationsfähigkeit, leichte Isolierbarkeit und ihr Multidifferenzierungspotential aus. Jeder vorteilhaften Eigenschaft ist jedoch eine Gefahr zuzuordnen. Die Risiken schließen ein unbegrenztes und unkontrolliertes Wachstum sowie einen instabilen Differenzierungszustand mit ein (Richter 2005).

Den letzten Risikopunkt betreffend kann man sagen, dass man durch das 3D-Pelletkulturmodell und die Zugabe des differenzierungsstimulierenden Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 in dieser Studie möglichst natürliche Bedingungen geschaffen hat, doch erreichen die Versuchsbedingungen noch nicht das Niveau des komplexen *in vivo* Milieus.

Die in 4.1. beschriebenen positiven Veränderungen im Verhalten der hBMSC innerhalb der Pelletkultur geben aber Hinweise, dass die gezüchteten Pellets zunehmend dem gesunden Knorpel ähneln könnten. Diese Erkenntnisse sind ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung, nämlich die Herstellung hyalinen Knorpels. Jedoch müssen weitere Optimierungen

des *in vitro* Protokolls und *in vivo* Untersuchungen stattfinden, um die herausragende Bedeutung der hBMSC weiter zu beurteilen und sie somit als autologe Zelltherapie im klinischen Einsatz verwenden zu können.

Menschlicher Knorpel hat nur ein sehr geringes Potential zur Selbstheilung. Die hier dargestellten Mechanismen zur Knorpelregeneration zeigen, welche Schwierigkeiten zu überwinden sind, den Knorpel qualitativ hochwertig wieder herzustellen. Zunehmend werden Ergebnisse veröffentlicht, die zeigen, dass Knorpelvorläuferzellen an der Knorpeloberfläche (Dowthwaite, Bishop et al. 2004) und möglicherweise auch in den tieferen Schichten zu finden sind (Alsalameh, Amin et al. 2004). Die lokale Anwesenheit von Hemmern wie IL-1 $\beta$  bei Defekten an der Knorpeloberfläche oder während einer krankheitsbedingten Erosion könnte die Differenzierung dieser Zellen zu Chondrozyten verhindern.

Hier konnte bewiesen werden, dass IL-1 $\beta$  und die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B für die Supprimierung der multilinearen Differenzierung der hBMSC nötig und ausreichend erscheint.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der adenovirale Gentransfer mit srI $\kappa$ B einen attraktiven therapeutischen Ansatz zur Runterregulierung der NF- $\kappa$ B aktivierten Gene in einer Entzündung bietet und folglich eine bessere Differenzierung der hBMSC zu Chondrozyten sichern würde. Für den angemessenen Einsatz dieser neuartigen Therapie müssen weitere *in vivo* Experimente durchgeführt werden.

## **5 Zusammenfassung**

Die Behandlung von Knorpel bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen ist aufgrund seiner schlechten Selbstheilung klinisch eine Herausforderung. In letzter Zeit hat die Forschung wichtige Erkenntnisse zur Bildung von Knorpel aus humanen mesenchymalen Stammzellen (hBMSC) gewonnen. Dieser mögliche Ansatz wurde in der vorliegenden Studie *in vitro* weiter untersucht. Der Hauptfokus der Experimente lag auf der Untersuchung des Einflusses des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  auf die Chondrogenese aus hBMSC. Es war möglich, die IL-1 $\beta$  induzierte Hemmung der Chondrogenese durch eine adenovirale Infizierung mit Ad.srI $\kappa$ B zu neutralisieren. Die metachromatische Färbung der Pellets zeigte, dass ein Wachstum in Abhängigkeit der Dosierung des Ad.srI $\kappa$ B in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  wieder erfolgreich stattfinden konnte. Selbst auf molekularer (Kollagen II, Aggrecan) und immunhistochemischer Ebene (Kollagen II) konnte eine erfolgreiche *in vitro* Differenzierung bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B abhängig die Chondrogenese der hBMSC stark hemmen können.

Leider war es nicht möglich, die unerwünschte *in vitro* Hypertrophie der Chondrozyten komplett zu beseitigen. Jedoch war es durch die Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges möglich, die Expression der terminalen Differenzierungsmarker (ALP und MMP-13) zu unterdrücken. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass das Genexpressionsmuster der gezüchteten Pellets zunehmend mehr dem gesunden, also dem gewünschten hyalinen Knorpel ähneln, als dem osteoarthrotischen, hypertrophen Gelenkknorpel. Jedoch müssen weitere Optimierungen des *in vitro* Protokolls stattfinden, um die herausragende Bedeutung der hBMSC weiter zu beurteilen, und sie somit als autologe Zelltherapie im klinischen Einsatz verwenden zu können.

Im Hinblick auf die Vielzahl möglicher Entzündungsmediatoren kann NF- $\kappa$ B einen alternativen Ansatz zur Knorpelregeneration bieten, da ihn verschiedene Zytokine aktivieren. Somit bietet die Regulierung von NF- $\kappa$ B möglicherweise einen effektiveren Ansatz zur Regeneration des Gelenkknorpels als die bloße Blockierung einzelner Zytokine.

Die vorliegende Studie kann die Grundlage zu weiteren Untersuchungen der Chondroprogenitorzellen darstellen, weil hBMSC eine wichtige Anlaufstelle für neue NF- $\kappa$ B inhibierende Therapien in arthritischen Gelenken sein könnten.

## 6 Material

### 6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ABI PRISM 7300 PCR Gerät	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Analysewaage	Denver Instrument Co., Denver, CO, USA
BD Falcon Zentrifugentuben (15ml, 50ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Brutschrank	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Durchflusszytometer Cytomics FC 500	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Elektrophoresekammern	E-C Apparatus Inc., Holbrook, NY, USA
Fluorometer DQ 300	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
Gefrierschrank - 20°C	Sears Holdings Corporation, Hoffman Estates, IL, USA
Gefrierschrank - 80°C	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Handschuhe	Fisher Scientific
Heizblock	Thermolyne, Dubuque, IA, USA
Kodak Image Station 2000 MM	Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA
Kühlschrank	Sears Holdings Corporation
Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5C Plus)	Thermo Scientific
Küvetten	Fisher Scientific
Luminometer (LB 953 Autolumat Plus)	Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA
Mehrkanalpipettierhilfe	Thermo Scientific
Shandon Finesse <sup>®</sup> Microtome	Thermo Scientific
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Mikroskop DM IL	Leica Microsystems
Neubauer Zählkammer	Reichert, Depew, NY, USA
Objektträger	Fisher Scientific
Optisches Messungsgerät	Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA
pH-Meter	Orion Research Inc., Boston, MA, USA
Photoapparat (digital)	Olympus, Center Valley, PA, USA
Pipettierhilfe	Fisher Scientific
Pipettierhilfe (elektrisch)	Fisher Scientific
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD Biosciences
Pipettenspitzen (0,1-1 µl, 1-10 µl, 1-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	VWR International, West Chester, PA, USA
Pyrex Tissue Grinder	Wheaton, Millville, NJ, USA
Reamer Irrigator Aspirator	Synthes, Paoli, PA, USA
Sicherheitsplättchen	Fisher Scientific
Spannungsgerät	E-C Apparatus Inc.
Sterilwerkbank	Thermo Scientific
Stickstofftank	Chart Industries Inc., Marietta, GA, USA
Tissue-Tek VIP Tissue Processing Center	Miles Scientific, Naperville, IL, USA

Tissue-Tek II Tissue Embedding Center	Miles Scientific, Naperville, IL, USA
UVmax Kinetic Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Vortexer	Fisher Scientific
Wasserbad	Precision Scientific Inc., Chicago, IL, USA
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences
Zellkulturplatten (96-well, Polypropylen)	Corning, Corning, NY, USA

## 6.2 Chemikalien und Reagenzien

Ad.NF- $\kappa$ B-Luc	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA
Affenserum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Agarose Gel (0,5%)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ammonium Persulfat	Sigma
Antibiotica-Antimykotica (AbAm)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chondroitin-6-Sulfat (Spezies: Hai)	Sigma-Aldrich
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich
Cytoseal <sup>TM</sup> XYL Moutain Medium	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA
Dexamethason	Sigma
Diaminobenzidin (DAB)	Vector Laboratories
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dimethylenblau (DMMB)	Sigma-Aldrich
DMEM Kulturmedium mit 1 mM Pyruvat (High- und low glucose)	Invitrogen
Ethanol	Aaper Alcohol, Shelbyville, KY, USA
EDTA Puffer	Invitrogen
Ficoll-Plaque <sup>TM</sup> PLUS	Stem Cell Technologies, Beverly, MA, USA
Fötale Kälberserum	Stem Cell Technologies
Glycin	Sigma
GLO Lysis Puffer	Promega, Madison, WI, USA
Haematoxylin	Fisher Scientific
Höchst Dye Lösung # 33258	Sigma-Aldrich
1% ITS + Premix	BD Biosciences
Kalbthymus DNS Standard	Sigma-Aldrich
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich
Lanthanchloridsalz	Sigma-Aldrich
Laemmli Stock Puffer 2X	Bio-Rad Laboratories Inc.
Methanol	Fisher Scientific
Milchpulver (fettarm)	Bio-Rad Laboratories Inc.
Molekulare Gewichtsmarker	Sigma
Natriumpyruvat (Sodium Pyruvate)	Sigma
NaCl	Sigma
Paraplast X-TRA <sup>®</sup> Tissue Embedding Medium (Paraffin)	Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA 4%)	Sigma-Aldrich
Phophat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100X)	Invitrogen

PCR Primer	Applied Biosystems
Prolin	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
PVDF Membran	Millipore
Recovery™ Cell Culture Freezing Medium	Invitrogen
SDS	Bio-Rad Laboratories Inc.
SuperScript III Reversetranskriptase	Invitrogen
TEMED	Fisher Scientific
Tris-Base	Sigma
Tris – HCl	Sigma
Trypanblau (0,4% Trypanblau in 0,85% NaCl)	Invitrogen
Toluidinblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 1 mM EDTA)	Invitrogen
Tween 20	FisherBiotech
Wasserstoffperoxid (30% w/v)	Sigma-Aldrich
Western Lightning™ Chemilumineszenz Reagenz Plus	PerkinElmer, Boston, MA, USA
Xylol	VWR International

### 6.3 Fertigkombinationen von Biochemikalien

Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
RC/DC Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories Inc.
RNAeasy Microkit	Qiagen, Valencia, CA, USA
Streptavidin-Merretichperoxidase Markierungskit	Dako, Carpinteria, CA, USA

### 6.4 Rekombinante Faktoren

Human basic fibroblast growth factor (FGF-2)	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)	Pepro Tech
Human Interleukin 1-β (IL-1β)	Pepro Tech

### 6.5 Antikörper

#### 6.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Spender	Hersteller
β-Aktin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
IκB-α	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
p-IκB-α (Ser 32)	Hase	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kollagen Typ I	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kollagen Typ II	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kollagen X	Ziege	Geschenk von Gary Gibson, Henny Ford Hospital, Detroit, MI, USA

**6.5.2 Sekundärantikörper**

Antikörper	Konjugat	Spender	Hersteller
Anti-IgG	HRP	Ziege	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti-IgG	Biotin	Affe	Santa Cruz Biotechnology

**6.6 Zelllinien / Zellen**

293CRE8	American Type Tissue Culture, Manassas, VA, USA
hBMSC	Patientenmaterial

**6.7 Medien**

Chondrogenes Wachstumsmedium (CWM)	DMEM – high glucose (beinhaltet L-Glutamin und Natriumpyruvat) 1% AbAm 1% ITS – Premix 40 µg/ml Prolin 100 nM Dexamethason 50 µg/ml Ascorbinsäure-2-phosphat
Einfriermedium	Recovery™ Cell Culture Freezing Medium mit 10% DMSO Anteil
Standardmedium	DMEM-Low glucose (beinhaltet L-Glutamin und Natriumpyruvat) 1% AbAm 10% FBS
Kulturmedium	Standardmedium 10 ng/ml FGF-2

**6.8 Puffer**

Lösungen für Zellkultur:

PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 l dH <sub>2</sub> O
-----	--

Lösungen für Western Blot:

Acrylamide / Bis	29,2 g Acrylamid 0,8 g N'N'-bis-Methylen-Acrylamid 100 ml dH <sub>2</sub> O
Blocking Puffer	5 g fettarmes Milchpulver 100 ml TBS-T Puffer
Dialyse Puffer	10 ml 1 M Tris - Base (pH 7,5) 40 ml 5 M NaCl 2 ml 0,5 M EDTA 80 g Sugrose ad 1l dH <sub>2</sub> O
Laemmli Puffer	950 µl 2X Laemmli Stock Puffer 50 µl β-Mercaptoethanol

Proteinase K-Puffer	30 mM Tris - Base 50 mM NaCl 10 mM CaCl <sub>2</sub>
„Resolving Gel“ Puffer	50 µl 10% APS 5 µl TEMED 10 ml dH <sub>2</sub> O
Running Puffer 10X	15,15 g Tris – Base 72 g Glycin 5 g SDS ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
„Stacking Gel“ Puffer	50 µl 10% APS 10 µl TEMED 10 ml dH <sub>2</sub> O
TBS – T Puffer	100 ml 10X TBS Puffer 900 ml dH <sub>2</sub> O 1 ml Tween-20
TNE 10x Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA 1,0 M NaCl pH 7,4
Transfer Puffer 10X	15 g Tris – HCl 72 g Glycin ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
Tris – gepufferte Salzlösung 10X (TBS)	3 g Tris Base 11,9 g Tris HCl 40 g NaCl 450 ml dH <sub>2</sub> O

## Lösungen für PCR:

Master Mix 2x Puffer	Applied Biosystems
RLT Puffer	Qiagen

## **7 Referenzen**

- Alsalamah, S., R. Amin, et al. (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(5): 1522-32.
- Arend (2003). The Cytokine Handbook. A. W. L. Thomson, M. T. Amsterdam, Academic Press. **4th edition**.
- Arenzana-Seisdedos, F., J. Thompson, et al. (1995). "Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B." Mol Cell Biol **15**(5): 2689-96.
- Aubin, J. E. (1998). "Bone stem cells." J Cell Biochem Suppl **30-31**: 73-82.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.
- Baltzer, A., Drever R., Granrath M., Godde G., Klein W., Wehling P. (2003). "Intraartikuläre Therapie der Gonarthrose mit autologen IL-1Ra." Sportmedizin **6**: 209.
- Bangari, D. S. and S. K. Mittal (2006). "Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity." Curr Gene Ther **6**(2): 215-26.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-71.
- Bauge, C., J. Attia, et al. (2008). "Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes." Arthritis Rheum **58**(1): 221-6.
- Bauge, C., F. Legendre, et al. (2007). "Interleukin-1beta impairment of transforming growth factor beta1 signaling by down-regulation of transforming growth factor beta receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes." Arthritis Rheum **56**(9): 3020-32.

- Bolton, M. C., J. Dudhia, et al. (1996). "Quantification of aggrecan and link-protein mRNA in human articular cartilage of different ages by competitive reverse transcriptase-PCR." Biochem J **319** ( Pt 2): 489-98.
- Brandt, K. D. (1987). "Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism in vitro and in vivo." Am J Med **83**(5A): 29-34.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Celeste, C., M. Ionescu, et al. (2005). "Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid." J Orthop Res **23**(3): 602-10.
- Delhalle, S., R. Blasius, et al. (2004). "A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways." Ann N Y Acad Sci **1030**: 1-13.
- Derfoul, A., A. D. Miyoshi, et al. (2007). "Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation." Osteoarthritis Cartilage **15**(6): 646-55.
- Djouad, F., D. Mrugala, et al. (2006). "Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair." Regen Med **1**(4): 529-37.
- Dowthwaite, G. P., J. C. Bishop, et al. (2004). "The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population." J Cell Sci **117**(Pt 6): 889-97.
- Engelhardt (2003). "Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa." Sportmedizin **6**: 171.
- Evans, C. H., S. C. Ghivizzani, et al. (2006). "Gene therapy for arthritis: what next?" Arthritis Rheum **54**(6): 1714-29.
- Evans, C. H., P. D. Robbins, et al. (2005). "Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8698-703.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle, et al. (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue." Biochim Biophys Acta **883**(2): 173-7.

- Fontana, A., H. Hengartner, et al. (1982). "Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **2**(2): 49-53.
- Gabay, C. (2000). "IL-1 inhibitors: novel agents in the treatment of rheumatoid arthritis." Expert Opin Investig Drugs **9**(1): 113-27.
- Ganten, D., Aicher, WK. (2003). Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen. Berlin, Springer.
- Goldring, M. B., J. Birkhead, et al. (1988). "Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes." J Clin Invest **82**(6): 2026-37.
- Gouze, J. N., A. Bianchi, et al. (2002). "Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway." FEBS Lett **510**(3): 166-70.
- Haberhauer, G., Dunky, A., Feyertag, J. (2003). "Knorpel-Stoffwechsel: Cartilage Oligomeric-Protein (COMP) als "Prognostikum" der Gelenkknorpeldestruktion." Journal für Mineralstoffwechsel **10**(1): 17-21.
- Hanada, K., L. A. Solchaga, et al. (2001). "BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis." J Cell Biochem **81**(2): 284-94.
- Hardy, S., M. Kitamura, et al. (1997). "Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination." J Virol **71**(3): 1842-9.
- Haupt, J. L., D. D. Frisbie, et al. (2005). "Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model." J Orthop Res **23**(1): 118-26.
- Husby, G. and R. C. Williams, Jr. (1988). "Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis." J Autoimmun **1**(4): 363-71.
- Iimuro, Y., T. Nishiura, et al. (1998). "NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration." J Clin Invest **101**(4): 802-11.

- Jobin, C., A. Panja, et al. (1998). "Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor kappaB super-repressor in human intestinal epithelial cells." J Immunol **160**(1): 410-8.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, et al. (1999). "IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation." J Immunol **163**(9): 5049-55.
- Kang, R., T. Marui, et al. (1997). "Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study." Osteoarthritis Cartilage **5**(2): 139-43.
- Kim, Y. J., R. L. Sah, et al. (1988). "Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258." Anal Biochem **174**(1): 168-76.
- Kopp, E. B. and S. Ghosh (1995). "NF-kappa B and rel proteins in innate immunity." Adv Immunol **58**: 1-27.
- Lefebvre, V., C. Peeters-Joris, et al. (1990). "Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes." Biochim Biophys Acta **1052**(3): 366-78.
- Li, X. and S. S. Makarov (2006). "An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17432-7.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lubberts, E. and W. B. van den Berg (2001). "Potential of modulatory cytokines in the rheumatoid arthritis process." Drug News Perspect **14**(9): 517-22.
- Lum, Z. P., B. E. Hakala, et al. (1996). "Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta." J Cell Physiol **166**(2): 351-9.

- Majumdar, M. K., E. Wang, et al. (2001). "BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1." J Cell Physiol **189**(3): 275-84.
- McNulty, A. L., F. T. Moutos, et al. (2007). "Enhanced integrative repair of the porcine meniscus in vitro by inhibition of interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha." Arthritis Rheum **56**(9): 3033-42.
- Miagkov, A. V., D. V. Kovalenko, et al. (1998). "NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13859-64.
- Miossec, P., C. A. Dinarello, et al. (1986). "Interleukin-1 lymphocyte chemotactic activity in rheumatoid arthritis synovial fluid." Arthritis Rheum **29**(4): 461-70.
- Moser, C., Baltzer, A., Reinecke, J., Wehling, P. (2005). "Die Rolle der Zytokine bei Knorpeldefekten und in der Knorpeltherapie." Arthroskopie **18**: 181-185.
- Moser, C., Wehling, P. (2002). Zytokinagonisten in der Behandlung der Gonarthrose. Fortbildung Orthopädie **6**. J. Jerosch, Heisel, J., Imhoff, AB. Darmstadt, Steinkopf.
- Murakami, S., V. Lefebvre, et al. (2000). "Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **275**(5): 3687-92.
- Palmer, G. D., E. Gouze, et al. (2003). "Gene transfer to articular chondrocytes with recombinant adenovirus." Methods Mol Biol **215**: 235-46.
- Palmer, G. D., A. Steinert, et al. (2005). "Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro." Mol Ther **12**(2): 219-28.
- Palmer, G. D., M. J. Stoddart, et al. (2008). "A simple, lanthanide-based method to enhance the transduction efficiency of adenovirus vectors." Gene Ther **15**(5): 357-63.
- Pelttari, K., A. Winter, et al. (2006). "Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and

- vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice." Arthritis Rheum **54**(10): 3254-66.
- Penick, K. J., L. A. Solchaga, et al. (2005). "High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells." Biotechniques **39**(5): 687-91.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Porter, R. M., Liu, F., Pilapil, C., Betz, O., Harris, M. B., Vrahas, M. S., Evans, C. H. (2008). "Osteogenic Potential of Reamer Irrigator Aspirator (RIA) Aspirate Collected from Patients Undergoing Hip Arthroplasty." in press.
- Rehman, K. K., S. Bertera, et al. (2003). "Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the Ikappa B kinase inhibitor Nemo-binding domain peptide." J Biol Chem **278**(11): 9862-8.
- Rheumaliga, D. (2001). "Zahlen und Fakten."
- Richter, W. (2005). "Stammzellen in der Knorpelforschung." Aktuelle Traumatologie **35**: 249-254.
- Richter, W. (2007). "Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis." Curr Opin Rheumatol **19**(5): 451-6.
- Roman-Blas, J. A., D. G. Stokes, et al. (2007). "Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage.
- Saklatvala, J. (1986). "Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage." Nature **322**(6079): 547-9.
- Simon, T. M. and D. W. Jackson (2006). "Articular cartilage: injury pathways and treatment options." Sports Med Arthrosc **14**(3): 146-54.

- Sitcheran, R., P. C. Cogswell, et al. (2003). "NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism." Genes Dev **17**(19): 2368-73.
- Skodacek, D. (2005). Der Einfluss von IGF-1 und TGFβ-2 auf Tissue-engineerten humanen Septumknorpel. Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. München, Ludwig-Maximilians Universität.
- Solchaga, L. A., K. Penick, et al. (2005). "FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **203**(2): 398-409.
- Steinert, A. F., S. C. Ghivizzani, et al. (2007). "Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage." Arthritis Res Ther **9**(3): 213.
- Teixeira, C. C., M. Hatori, et al. (1995). "A rapid and ultrasensitive method for measurement of DNA, calcium and protein content, and alkaline phosphatase activity of chondrocyte cultures." Calcif Tissue Int **56**(3): 252-6.
- Toussirot, E. and D. Wendling (2007). "The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update." Expert Opin Pharmacother **8**(13): 2089-107.
- Tyler, J. A. (1985). "Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin 1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules." Biochem J **227**(3): 869-78.
- Wehling, P., C. Moser, et al. (2007). "Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy." BioDrugs **21**(5): 323-32.
- Yocum, D. E., J. B. Allen, et al. (1986). "Inhibition by cyclosporin A of streptococcal cell wall-induced arthritis and hepatic granulomas in rats." Arthritis Rheum **29**(2): 262-73.
- Yocum, D. E., L. Esparza, et al. (1989). "Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis." Cell Immunol **122**(1): 131-45.
- Yoo, J. U., T. S. Barthel, et al. (1998). "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells." J Bone Joint Surg Am **80**(12): 1745-57.

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Chris Evans und Dr. Ryan Porter für die Ermöglichung dieses Projektes. Ihr Wissen, ihre Begeisterung für das Thema, die Geduld und der unermüdliche Enthusiasmus haben in einem ganz erheblichen Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. With you guys, I learned to enjoy research. Thank you.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des „Center for Molecular Orthopaedics“ am Brigham and Women’s Hospital in Boston, USA und Dr. Glyn Palmer vom „Hospital for Joint Diseases“ in New York, USA. Sie alle waren mir eine große Unterstützung in der Versuchsdurchführung, der Datenanalyse sowie bei Fragen im Laboralltag.

Außerdem möchte ich mich für die umfassende Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen bei Prof. Dr. med. Peter Müller bedanken.

Auch möchte ich mich bei Dr. med. Matthias Pietschmann für seine umfangreiche Hilfestellung in der Anfangsphase bedanken.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und konstruktive Kritik in meiner Schreibphase möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Dr. Birte Sievers bedanken. Ohne sie wäre der erfolgreiche Abschluss dieses Projektes nicht möglich geworden.

Martin Seemann danke ich für die Zuwendung, das geduldige Zuhören und die immer passende Ablenkung oder Aufmunterung während der gesamten Zeit.

Der größte Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Schwester. Ohne ihre ausdauernde und vielseitige Unterstützung wäre die Umsetzung meiner Promotion und meines Studiums nicht möglich gewesen.

Die Dissertation wurde mit Mitteln aus einem NIH/NIBIB Grant des National Institute of Health, USA (F32 EB005566) und Geldern der AO Foundation in Davos, Schweiz (Projekt-Nummer: 04-B86) finanziert.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

München, den 23.06.2010

Nathalie Wehling