

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Hein)

**Regulation der Proliferation, Apoptose und Funktion
humaner Chondrozyten**

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. David Wohlrab
geboren am 11. März 1971 in Halle/S.

Verteidigt am 06.12.2005
Antrittsvorlesung am 17.01.2006

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. W. Hein
2. Prof. Dr. med. W. Neumann
3. Prof. Dr. med. J. Grifka

urn:nbn:de:gbv:3-000009697

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009697>]

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Für die Entstehung der Arthrose sind neben mechanischen Faktoren in jüngster Vergangenheit verschiedene Befunde über biochemische und molekulare Abläufe beschrieben worden. Die Kenntnisse über die Beeinflussung von spezifischen Zellmembraneigenschaften und die daraus resultierenden Veränderungen bestimmter Funktionszustände der Chondrozyten, wie sie von Untersuchungen an anderen Zellsystemen bereits bekannt sind, sind bisher nicht ausreichend.

Es wurde der Einfluss der Ionenkanal-modulierenden Testsubstanzen 4-Aminopyridin (4-AP), Lidocain, Verapamil und SITS (4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure) auf humane arthrotische Chondrozyten untersucht. Der Natriumkanalblocker Lidocain, der Kaliumkanalblocker 4-AP und der Chlorid- und Anionenkanalhemmer SITS führten zur temporären Steigerung der Chondrozytenproliferation. Der Kalziumantagonist Verapamil bewirkte, wie alle anderen Testsubstanzen auch, eine Verschiebung des Membranpotentials an der Zellmembran humaner Chondrozyten.

Neben den Vorgängen der Zellneubildung ist für die Homöostase eines biologischen Systems der programmierte Zelltod (Apoptose) von entscheidender Bedeutung. Durch die gezielte Steuerung der Ionenkanalaktivität an der Zellmembran lässt sich das Apoptoseverhalten humaner Chondrozyten regulieren.

Für die Dynamik eines biologischen Systems spielen neben den Fragen der Zellneubildung und des programmierten Zelltodes Regulationsvorgänge von Stoffwechsellleistungen eine entscheidende Rolle. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass die Expression des zelleigenen Oberflächenrezeptors CD44, der bei Chondrozyten wesentlich die Bindung von extrazellulärer Hyaluronsäure steuert, durch Ionenkanalmodulation beeinflusst wird. Des Weiteren wird auch die Synthese von Kollagen II, einem wichtigen Baustein der extrazellulären Matrix, durch Ionenkanalmodulation verändert.

Die hier dargestellten Befunde sind als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu verstehen, die dazu beitragen, die Zusammenhänge unterschiedlicher feinstruktureller und biochemischer Steuerungs- und Regulationsvorgänge bei humanen Chondrozyten besser zu erkennen, und so die Erarbeitung neuer therapeutischer Optionen für die Arthrosebehandlung zu ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	1
1.1	Struktur – Funktion des hyalinen Knorpelgewebes	2
1.2	Arthroseinitiation.....	3
1.3	Zellmembran und Chondrozytenfunktion.....	4
1.4	Zielstellung der Arbeit	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Zellkultur humaner Chondrozyten.....	7
2.1.1	Präparation humaner Chondrozyten	7
2.1.2	Kulturbedingungen humaner Chondrozyten	9
2.2	Testsubstanzen.....	11
2.3	Durchflusszytometrische Bestimmungen	12
2.3.1	Methodische Grundlagen.....	12
2.3.2	Bestimmung des Membranpotentials humaner Chondrozyten.....	14
2.3.3	Einfluss verschiedener Ionenkanalmodulatoren auf das Membranpotential	15
2.3.4	Bestimmung der DNA-Verteilungsmuster humaner Chondrozyten.....	16
2.4	Bestimmung der Chondrozytenproliferation	18
2.5	Apoptose	19
2.5.1	Methodische Grundlagen.....	19
2.5.2	Nachweis der Translokation des Phosphatidylserins (Annexin V)	20
2.5.3	Nachweis des Mitochondrienmembran-spezifischen Proteins Apo2.7	22
2.5.4	Nachweis der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18	24
2.6	Zelluläre Leistungen humaner Chondrozyten	26
2.6.1	Bestimmung der CD44-Expression	26
2.6.2	Bestimmung der Synthese von Kollagen Typ I und Typ II.....	28
2.7	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Durchflusszytometrische Bestimmung des Membranpotentials humaner Chondrozyten	32
3.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Beeinflussung des Membranpotentials humaner Chondrozyten durch Ionenkanalmodulatoren	35
3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der DNA-Verteilungsmuster humaner Chondrozyten	37

3.4	Bestimmung der Chondrozytenproliferation mit ^3H -Thymidin	39
3.5	Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Proliferation humaner Chondrozyten	41
3.6	Apoptose	43
3.6.1	Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin (Annexin V)	43
3.6.2	Nachweis des Mitochondrienmembranproteins Apo2.7	53
3.6.3	Nachweis der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18	57
3.7	Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die CD44-Expression humaner Chondrozyten	62
3.8	Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Synthese von Kollagen Typ I und Typ II.....	66
4	<i>Diskussion</i>	69
4.1	Pathomechanismus der Arthrose	69
4.2	Modulation der Chondrozytenfunktion	74
4.2.1	Bedeutung des Membranpotentials	75
4.2.2	Regulation der Chondrozytenproliferation.....	80
4.2.3	Beeinflussung der Apoptose von Chondrozyten	86
4.3	Modulation spezifischer StoffwechsellLeistungen von Chondrozyten	91
4.3.1	Modulation der CD44-Expression.....	91
4.3.2	Modulation der Kollagensynthese	93
4.4	Schlussfolgerungen.....	96
5	<i>Zusammenfassung</i>	98
6	<i>Literatur</i>	102
7	<i>Thesen</i>	120

Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

3D-Kultur	Dreidimensionale Zellkultur
4-AP	4-Aminopyridin
ANOVA	Einweg-Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
[Cl ⁻] _i	intrazelluläre Chloridionenkonzentration
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
DI	DNA-Index
DIDS	4',4'-Diisothiocyanato-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	disintegrates per minute
ECM	Extrazellulärmatrix
ENaC	Epithelialer Natriumionenkanal
EZF	Extrazellulärflüssigkeit
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fas	CD95 (APO-1)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Light Scatter
G ₀ -Phase	Ruhephase
GM-CSF	Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor
³ H-Thymidin	Tritium-Thymidin
H-Test	Kruskal-Wallis-Test
IGF-1	Insulin like Growth Factor-1
IK	Isotyp-Kontrolle
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (o.a. Synthetase)
IZF	Intrazellulärflüssigkeit

kD	Kilo-Dalton
$[K^+]_e$	extrazelluläre Kaliumionenkonzentration
KT	Kulturtag
Lido	Lidocain
MG	Molekulargewicht
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrixmetalloproteinase
M-Phase	Mitosephase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nicht-Steroidale Antirheumatika
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PI	Propidiumjodid
pS	Pikosiemens
RHAMM	Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility
$\pm s$	Standardabweichung
S-Phase	Synthesephase
SITS	4-Acetamido-4-isothiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure
SSC	Side Scatter
TEA	Tetraethylammonium
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TTX	Tetrodotoxin
Verap	Verapamil
VRAC	Volumen-regulierender Anionenkanal
\bar{x}	Mittelwert

1 Einleitung

Der Binnenraum eines Gelenkes (Diarthrose, *Junctura synovialis*) wird durch den Gelenkknorpel und die Synovialmembran unmittelbar begrenzt. Sie bilden zusammen mit der Gelenkflüssigkeit eine funktionelle Einheit, welche durch weitere sie umgebende Strukturen wie die fibröse Gelenkkapsel und den subchondralen Knochen unterstützt wird. Der Kapsel-Bandapparat und die auf das Gelenk einwirkende Muskulatur fördern bei Gelenkbewegungen und bei Belastung eine homogene Verteilung der einwirkenden Kräfte, begünstigen die Ernährung des Gelenkknorpels und dienen gleichzeitig auch zur Gelenkführung und zum mechanischen Schutz.

Der hyaline Gelenkknorpel wirkt auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften immer stoßdämpfend – elastisch, ermöglicht eine optimale Kraftübertragung und ist zusammen mit der Gelenkflüssigkeit für ein reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen verantwortlich. Er hält Druckschwankungen von 100 bis 200 Atmosphären und bei sportlicher Betätigung zum Teil noch vielfach höheren Druckschwankungen stand [83].

Die Synthese der hyalinen Knorpelmatrix erfolgt durch ein spezielles Zellsystem, den Chondrozyten, denen damit für die normale Struktur – Funktion des Gelenkknorpels eine zentrale Bedeutung zukommt. Gelenkknorpel von Kindern und Jugendlichen erhalten Teile der Nährstoffe in tieferen Zonen aus Markgefäßen des subchondralen Knochens. Diese Form der Ernährung bleibt auf Grund der Ausbildung einer Verkalkungszone dem Knorpelgewebe des Erwachsenen verschlossen. Dieser ist frei von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen und ernährt sich ausschließlich durch Diffusion vom Gelenkspalt, die durch wechselnde Druckbelastung maßgeblich gefördert wird. Die Zufuhr von Nährstoffen erfolgt über die Schichten der Synovialmembran, die Gelenkflüssigkeit und die extrazelluläre Matrix zum Chondrozyten. In gleicher Weise werden Stoffwechselabbauprodukte abtransportiert. Hauptaufgabe der Synovialmembran ist weniger die Rolle als Permeabilitätsbarriere sondern viel mehr die durch B-Zellen synthetisierten unterschiedlichen Bestandteile der Gelenkflüssigkeit und deren „Entschlackung“. Hauptprodukt der B-Zellen ist die Hyaluronsäure, welche in die Gelenkflüssigkeit abgegeben wird. Aufgrund dieser Mechanismen überwiegen im Knorpelgewebe anaerob ablaufende Stoffwechselprozesse. Chondrozyten sind auch bei sehr geringen Sauerstoffbedingungen (bis zu einem Sauerstoffpartialdruck von bis zu 1%) in der Lage, ihre physiologischen Funktionen aufrecht zu halten [83].

1.1 Struktur – Funktion des hyalinen Knorpelgewebes

Der Gelenkknorpel überzieht die artikulierenden Knochenenden als wenige Millimeter dicke Schicht. Sie kann eine Dicke von bis zu 7 mm erreichen [83]. Die Chondrozyten nehmen mit 1 % bis 10% nur einen sehr geringen Teil des Knorpelgewebes ein. Hauptbestandteil ist mit 70-80% Volumenanteilen Wasser. Die übrigen Bestandteile sind vom Chondrozyten synthetisierte und in den extrazellulären Raum exprimierte Matrixbausteine. Diese sind im hohen Maße wasserbindungsfähig und werden unter dem Begriff extrazelluläre Matrix zusammengefasst. Sie erscheinen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch gläsern (hyalin). Neben Wasser besteht die extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Kollagenen (ca. 12-14%). Mit 95% aller Kollagentypen kommt dabei dem Kollagen Typ II die größte Bedeutung zu. Kollagen Typ IX und XI machen nur einen sehr geringen Anteil der Gesamtkollagenmasse aus [83]. Die übrige extrazelluläre Matrix wird im Wesentlichen durch Glucosaminglycane gebildet. Hierbei handelt es sich um unverzweigte Polysaccharidketten. Sie werden in vier Hauptgruppen unterschieden: 1. Hyaluronan, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfan, 3. Heparansulfat und Heparin und 4. Keratansulfat. Mit Ausnahme des Hyaluronan liegen die Glucosamine an Proteine gebunden vor und werden dann als Proteoglycane bezeichnet [6].

Histologisch werden mehrere Schichten im hyalinen Knorpel unterschieden. Die zum Gelenkbinnenraum zugewandten Seite wird als oberflächlichste Schicht oder Gleit- bzw. Tangentialfaserzone bezeichnet. Sie ist nur wenige 100 µm dick, die Chondrozyten dieser Zone sind parallel zum flachen Kollagenfasergerüst angeordnet und wirken „fibroblastenähnlich“. Die zweite Zone wird als Übergangszone bezeichnet. Hier finden sich unregelmäßig angeordnete Chondrozyten im sich überschneidenden Kollagenfasergerüst. An die Übergangszone grenzt die Radiärzone. Hier sind die Chondrozyten und das Kollagenfasergerüst senkrecht (radiär) zur Gelenkfläche angeordnet. Diese dritte Zone ist die dickste Zone des Gelenkknorpels. Unterhalb der Radiärzone stellt sich im histologischen Bild eine färberische Grenzlinie, die Tide mark, dar. Darunter liegt die vierte Zone, die Mineralisationszone. Hier zeichnet sich eine zunehmende Verknöcherung ab. Die Chondrozyten sind hier degenerativ verändert. Es treten Hypertrophien, Brutnesterbildung und blasige Veränderungen auf. Die Mineralisationszone stellt den Übergang zum subchondralen Knochen dar [83].

Intakte feinstrukturelle Eigenschaften des hyalinen Knorpelgewebes sind eine wesentliche Voraussetzung für die optimale Kraftübertragung und das reibungsfreie Gleiten der Gelenkpartner.

1.2 Arthroseinitiation

Der bei der Arthrose zu beobachtende klassische Verlust des Gelenkknorpels beginnt in der Regel als fokaler Prozess. Er lässt sich tierexperimentell beispielsweise durch partielle Menishektomie oder aber auch durch Ruptur des vorderen Kreuzbandes induzieren. Klinisch imponieren diese lokalen Knorpelschädigungen durch Ausfransungen der Knorpeloberfläche im betroffenen Gelenkabschnitt. Beim Menschen können sich diese primär fokalen Prozesse ausdehnen und so ein oder mehrere Gelenkkompartimente umfassen. Dies führt zu Störungen in der Kraftübertragung und dem Gleitverhalten des Knorpelgewebes und daraus resultierender Progredienz der Knorpelschädigung.

Für die Entstehung und Progredienz einer degenerativen Gelenkerkrankung sind eine Vielzahl von Faktoren bedeutsam, die überwiegend nicht isoliert auftreten, sondern in unterschiedlicher Kombination und Intensität die Erkrankung individuell charakterisieren. Unter den mechanischen Einflüssen sind vor allem der Body Mass Index (BMI), berufliche Belastungen und Freizeitaktivitäten zu nennen (vgl. S. 69 ff) [134]. Daneben wurden durch fortschreitende Kenntnisse in der biomedizinischen Grundlagenforschung verschiedene biochemische und molekulare Mechanismen erkannt, die für die Entstehung und den Ablauf der Arthrose von Bedeutung sind. Sie führen über Störungen der Chondrozytenproliferation und -funktion zur Destabilisierung des Knorpels als biologisches System. So wurden in diesem Zusammenhang die Wirksamkeit der Matrixmetalloproteinasen (MMP's) und deren Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP's)), von Zytokinen (insbesondere Interleukin 1), des Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) sowie unterschiedliche Bone Morphogenetic Proteins (BMP's) beschrieben (vgl. S. 69 ff). Neben dem daraus resultierenden verbesserten Verständnis der Entstehung und des Ablaufes der Arthrose ergeben sich aber auch gleichzeitig Ansätze zur Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren oder Optimierungsmöglichkeiten für bekannte Behandlungsmethoden.

1.3 Zellmembran und Chondrozytenfunktion

Entsprechend der zentralen Bedeutung der Chondrozyten und ihrer Stoffwechselprodukte für eine normale Funktions-Struktur des Gelenkknorpels sind die Kenntnis der Regulationsvorgänge bei der Steuerung der zellulären Prozesse und ihrer spezifischen Stoffwechselleistungen von größtem Interesse. Die bisher bekannten Mechanismen sind sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei der Entstehung und der Progredienz der Arthrose zwar als sehr komplex erkannt, jedoch derzeit nur unvollständig zu beurteilen. Wenig berücksichtigt sind u.a. elektrophysiologische Abläufe und Veränderungen an der Zellmembran humaner Chondrozyten, die bekanntlich an der Regulation unterschiedlicher Zellfunktionen maßgeblich beteiligt sind. So wurde bei verschiedenen anderen Zellsystemen ein Zusammenhang zwischen der Ionenkanalaktivität und der Proliferation nachgewiesen [29, 40]. Der Einfluss der Ionenkanalaktivität auf das Wachstumsverhalten und spezifischer Stoffwechselleistungen humaner Chondrozyten ist bisher nur unzureichend untersucht. Transmembranäre Kanalproteine, welche vom Extrazellulärraum bis in das Zytoplasma reichen, sind in jeder tierischen und pflanzlichen Zellmembran nachweisbar. Diese Proteine besitzen zentral gelegene, hochselektive Poren, welche für den Transport von anorganischen Ionen spezialisiert sind. Diese Kanalproteine werden deshalb als Ionenkanäle bezeichnet. Im Unterschied zur einfachen wassergefüllten Pore besitzen Ionenkanäle eine Selektivität für bestimmte Ionensorten und sind nicht ständig geöffnet. Sie besitzen sogenannte Schleusen oder Tore (engl.: gates) welche sich als Reaktion auf spezifische Reize kurzzeitig öffnen und sonst geschlossen sind. Diese Ionenkanäle besitzen eine enorme Leistungsfähigkeit. So ist ein Ionenkanal in der Lage, mehr als 1 Million Ionen pro Sekunde zu transportieren. Dies entspricht dem 1000-fachen der Transportrate der schnellsten Carrier-Systeme [165].

Die Aufgabe der Ionenkanäle besteht also darin, verschiedenen anorganischen Ionen, hauptsächlich Na^+ , K^+ , Ca^{2+} bzw. Cl^- , eine schnelle Diffusion durch die Lipid-Doppelschicht zu ermöglichen. Diese Diffusion erfolgt entlang dem elektrochemischen Gradienten. Der Ionen-transport durch die Kanalproteine wird durch vielfältige Mechanismen reguliert. Als wichtigste Reizarten, welche zur Öffnung von Ionenkanälen führen, sind die Veränderung der Spannung zwischen beiden Seiten der Zellmembran (Spannungs-kontrollierte Kanäle), Dehnung der Zellmembran bzw. des Zytoskeletts (Dehnungs-kontrollierte Kanäle) sowie die Bindung eines Signalmoleküls (Liganden-kontrollierte Kanäle) bekannt. Bei letztgenanntem kann das Signalmolekül ein extrazellulärer Botenstoff (z.B. ein Hormon), der außen an das Kanalprotein bindet, ein membranassoziiertes Molekül (z.B.

eine Untereinheit eines G-Proteins) oder ein intrazellulärer Botenstoff (sog. zweiter Bote) sein. Die Aktivität vieler Ionenkanäle wird zusätzlich durch Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung reguliert.

Die Fähigkeit zur Regulation des Ionenflusses ist für viele Zellfunktionen unbedingt erforderlich. Als Beispiel seien die Nervenzellen genannt, bei denen Ionenkanäle so spezialisiert sind, dass diese zum Empfang, zur Weiterleitung und Übertragung von Signalen dienen [5].

Es liegt deshalb nahe, den Einfluss der Modulation der Wirksamkeit von Ionenkanälen auf das Wachstumsverhalten und spezifische Stoffwechsellleistungen humaner Chondrozyten zu untersuchen. Chondrozyten gehören zu den nicht erregbaren Zellsystemen. Unter diesem Begriff werden Zellsysteme zusammengefaßt, an deren Zellmembran unter physiologischen Bedingungen keine Aktionspotentiale (wie z. B. bei Muskel- oder Nervenzellen) ausgelöst werden können, die aber, wie alle lebenden Zellsysteme, ein Ruhemembranpotential besitzen. Voraussetzung für die Entstehung dieses Membranpotentials ist das Vorhandensein von Ionenkanälen an der Zellmembran. Wir haben bei der Auswahl der Modulatoren einerseits auf Substanzen zurückgegriffen, deren Wirksamkeit bei anderen Zellsystemen bekannt ist, andererseits darauf geachtet, den Austausch sehr unterschiedlicher Ionen zu beeinflussen (vgl. Tab. 2).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Zu den vorliegenden Untersuchungen wurden humane Chondrozyten in vitro kultiviert und der Einfluss verschiedener Ionenkanal-modulierender Substanzen gemessen. Dazu wurden neben dem Membranpotential der Zellmembran das Wachstumsverhalten der Chondrozyten hinsichtlich ihrer Proliferation und Apoptose sowie spezifische Stoffwechsellleistungen untersucht. Insbesondere versuchten wir folgende Fragen zu beantworten:

1. Lässt sich an der Zellmembran humaner Chondrozyten das Membranpotential durchflusszytometrisch bestimmen?
2. Wird das Membranpotential an der Zellmembran humaner Chondrozyten durch den Einsatz der Ionenkanalmodulatoren Lidocain, Verapamil, 4-Acetamido-4-isothiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure (SITS) oder 4-Aminopyridin (4-AP) beeinflusst?
3. Welche DNA-Verteilungsmuster weisen arthrotische Chondrozyten auf?
4. Kann das Proliferationsverhalten humaner Chondrozyten durch Ionenkanalmodulation beeinflusst werden?
5. Wird das Apoptoseverhalten humaner Chondrozyten durch die Modulation der Wirksamkeit von Ionenkanälen an der Zellmembran verändert?
6. Ist eine Änderung von spezifischen Stoffwechsellleistungen humaner Chondrozyten, wie CD44-Rezeptorexpression oder Kollagensynthese durch gezielte Regulation der Ionenkanalaktivität nachweisbar?
7. Ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen praxisnutzbare Hinweise für die Prophylaxe und/oder Therapie der Arthrose?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur humaner Chondrozyten

2.1.1 Präparation humaner Chondrozyten

Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten an humanen Chondrozyten, welche aus arthrotisch verändertem Kniegelenksknorpel isoliert wurden. Verwendung fand ausschließlich das Knorpelgewebe der Femurkondylen und bei erheblicher Achsfehlstellung nur Knorpel des jeweils geringer belasteten Areals. Da es sich bei der überwiegenden Mehrheit der Präparate um Knorpelgewebe aus Kniegelenken mit einer Varusgonarthrose handelte, wurde zumeist Knorpelgewebe aus dem lateralen Kompartiment benutzt. Das Knorpelgewebe stammte von Patienten, welche nicht an relevanten Nebenerkrankungen, insbesondere nicht an rheumatoider Arthritis, erkrankt waren.

Intraoperativ wurden die Knochen-Knorpelfragmente zunächst in steriles L15 Medium (Seromed, Berlin, Deutschland) als Transportmedium überführt. Anschließend erfolgten unter sterilen Bedingungen die Ablösung des Knorpelgewebes von subchondralen Knochen mittels Skalpell sowie eine scharfe Durchtrennung des Gewebes in ca. 1 mm³ große Fragmente. Die Abb. 1 zeigt einen entsprechenden Arbeitsplatz zur Präparation des Knorpelgewebes. Die enzymatische Isolierung der Chondrozyten aus den Knorpelstücken wurde entsprechend dem in Tab. 1 beschriebenen Vorgehen durchgeführt.

Tab. 1: Arbeitsvorschrift zur Isolierung von Chondrozyten aus humanem Kniegelenksknorpel

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurden in den jeweiligen Lösungen unter sterilen Bedingungen bei 37°C mit Magnetrührer durchgeführt

- Für 5 min. in PBS-Pufferlösung unter Zusatz von 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 IE/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin) (Seromed)
- Absaugen der Pufferlösung mit Pipette
- Für 60 min. in 30 ml F12 Medium (Seromed) unter Zusatz von 123 mg Pronase (Seromed), 1,5% fetales Kälberserum (FKS) (Seromed) sowie 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung
- Medium absaugen

- Für 16 Stunden in 30 ml F12 Medium (Seromed) mit 15 mg Kollagenase A (Boehringer, Mannheim, Deutschland), 1.5% FKS und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung
- Isolation der Chondrozyten aus der Suspension durch Filtration mit sterilen Sieben (NUNC GmbH, Wiesbaden) mit einer Porengröße von 70 µm und 40 µm.
- Zellsuspension für 6 min. bei 1000 U/min. zentrifugieren und anschließend dreimal mit PBS-Pufferlösung (Seromed) spülen
- 100 µl dieser Zellsuspension werden mit 400 µl PBS-Pufferlösung verdünnt und in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben
- Bestimmung der Zellanzahl durch Auszählen von fünf Gruppenquadraten und Berechnung der Gesamtzellanzahl wie folgt:

Summe der Zellen in den Quadraten

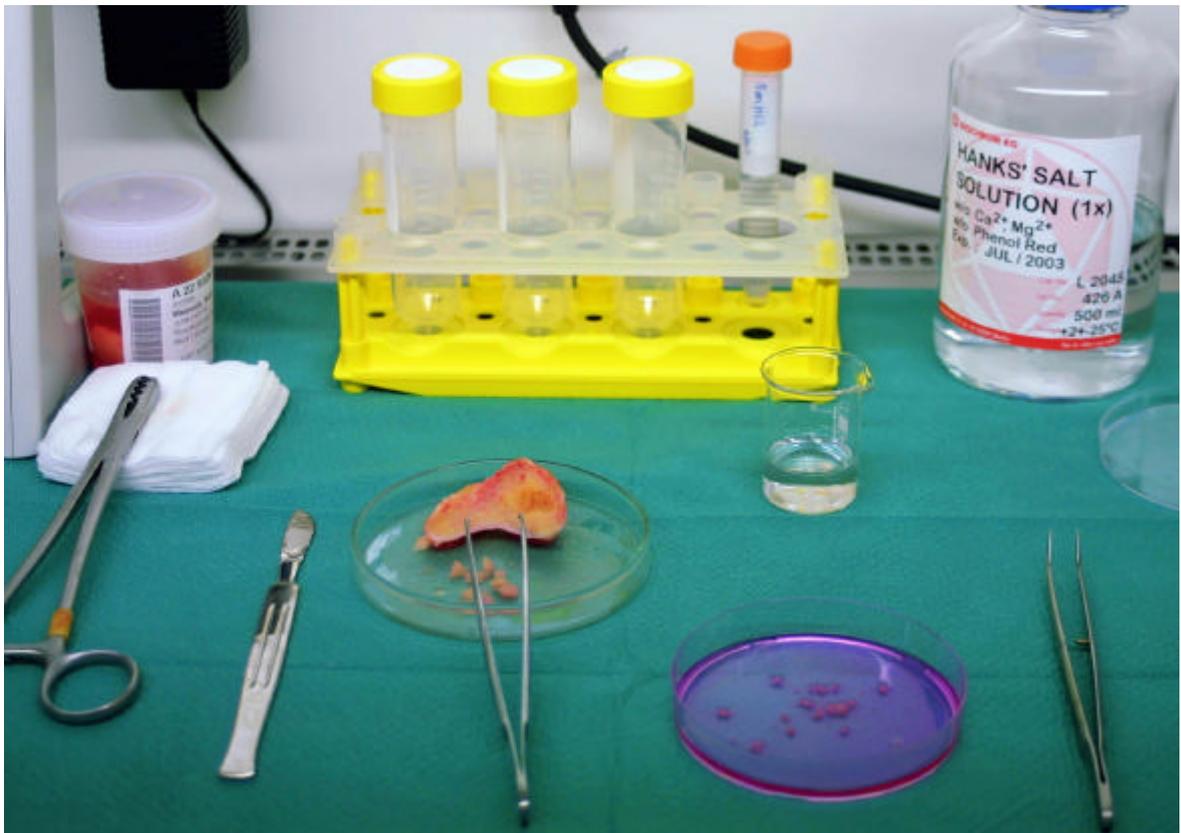
x 1000 (Kammerinhalt)

x 5 (Verdünnung)

x Volumen der gewonnenen Zellsuspension in ml

= Anzahl der gewonnenen Zellen in der Zellsuspension

Abb. 1: Arbeitsplatz zur Präparation des Knorpelgewebes mittels Skalpell

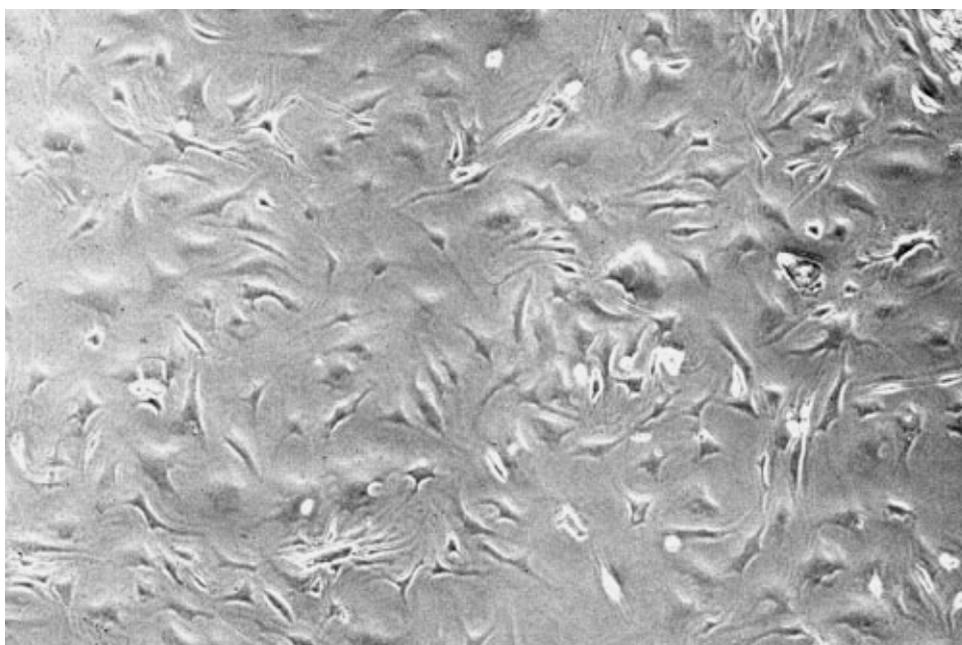


2.1.2 Kulturbedingungen humaner Chondrozyten

Zunächst wurden die Chondrozyten entsprechend beschriebenen Vorgehen für die Kultivierung präpariert (Tab. 1). Nach der Bestimmung der Gesamtzellanzahl wird das Reagenzglas mit der Zellsuspension bei 1000 U/min. 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und der Bodensatz gut aufgeschüttelt. Nun wird das Reagenzglas entsprechend der Gesamtzellanzahl mit Kulturmedium aufgefüllt, so dass sich in 1 ml Suspension 1 Million Zellen befinden. Die Chondrozyten wurden in RPMI-Medium (Seromed) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Seromed) 50 µg/ml Gentamycinsulfat (Seromed) und 2 µg/ml Amphotericin B (Seromed) bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank kultiviert. Die Einsaat der Zellen erfolgte in einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/cm². Der Wechsel des Kulturmediums wurde dreimal wöchentlich durch Absaugen des Mediums mittels Pipette vom Rand des Kulturgefäßes und anschließender Zugabe von frischem temperierten Kulturmedium vorgenommen. Die Kulturdauer war für

die nachfolgend beschriebenen Versuchsansätze unterschiedlich und ist bei der jeweiligen Beschreibung der Versuchsanordnung aufgeführt. Am Ende der Kulturdauer wurde das Zellkulturmedium mit Hilfe einer Pipette vom Kulturgefäßrand abgesaugt, anschließend zum Ablösen der Chondrozyten vom Boden des Kulturgefäßes dieser mit 0,05%-igem Trypsin (Gibco) für 15 Minuten bedeckt. Die Abb. 2 zeigt ein mikroskopisches Bild einer Monolayer-Kultur humaner Chondrozyten.

Abb. 2: kultivierte humane Chondrozyten (Monolayerkultur), 4. Kulturtag, 200-fache mikroskopische Vergrößerung



2.2 Testsubstanzen

Als Modulatoren der Ionenkanalaktivität wurden Substanzen mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum ausgewählt. Neben den als Arzneistoffe bekannten Substanzen Lidocain und Verapamil, kamen auch die Wirkstoffe 4-Aminopyridin (4-AP) und 4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure (SITS) zum Einsatz. Lidocain ist als spannungsabhängige Na⁺-Kanal blockierende Substanz bekannt und wird vielfach als Lokalanästhetikum eingesetzt [89]. Verapamil blockiert vorwiegend spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ in glatten und Herzmuskelzellen. Diesem Effekt werden die vasodilatativen und antiarrhythmischen Eigenschaften des Verapamil zugeschrieben [89]. 4-AP ist ein unspezifischer spannungsabhängige K⁺-Kanalblocker [168]. SITS blockiert Anionenkanäle mit Leitfähigkeiten für Cl⁻ und einige andere Anionen (z.B. Aspartat). Gleichzeitig ist eine hemmende Wirkung auf die Anionenaustauscher-Proteine bekannt [162, 163].

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Testsubstanzen und deren Funktion

Ionenkanal-modulator	Funktion	Hersteller
Lidocain	Natriumkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
4-Aminopyridin (4-AP)	Kaliumkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure (SITS)	Chlorid-u. Anionenkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
Verapamil	Calciumkanalblocker	ICN-Biomedicals Inc. Aurora / Ohio, USA

2.3 Durchflusszytometrische Bestimmungen

2.3.1 Methodische Grundlagen

Eine moderne Methode zur simultanen Analyse von chemischen und physikalischen Eigenschaften von Einzelzellen ist die Durchflusszytometrie. Ihr zugrunde liegen verschiedene Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Einzelzellen. Die Durchflusszytometrie zeichnet sich durch eine hohe Analysegeschwindigkeit, eine objektive Quantifizierung, eine hohe Empfindlichkeit sowie auf Grund der großen gemessenen Zellanzahl durch eine große statistische Sicherheit aus.

Voraussetzung für die Untersuchung der Einzelzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist ihr Vorliegen in einer Zellsuspension. Nachdem bestimmte Eigenschaften der Zellen mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes oder auch mittels an Antikörper gekoppelten Farbstoffs markiert wurden, können sie dem Messvorgang zugeführt werden. Die Zellen erreichen einzeln den Messpunkt der Messkammer. Hier werden sie für wenige Millisekunden einem Laserlichtstrahl ausgesetzt. Dabei werden die Lichtstreuung und die Fluoreszenzintensität der Einzelzelle registriert. Für diese Arbeit wurde ein analytisches 5-Parameter-Durchflusszytometer (Becton und Dickinson, Heidelberg) verwendet. Es kann 2 Lichtstreuungen und 3 Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen gleichzeitig registrieren. Als Systemsoftware wurde CellQuest[®] (Becton Dickinson) benutzt. Für die Messung der Fluoreszenzen und für die Weiterverarbeitung der Messwerte im Durchflusszytometer wurde die Software ModFit LT 2.0[®] (Becton Dickinson) verwendet. Bei der Lichtstreuung wird das einfallende Laserlicht durch die Zelle ungleichmäßig in verschiedene Richtungen gebrochen. Die Wellenlängen des einfallenden und gestreuten Lichtes unterscheiden sich jedoch nicht. Im Durchflusszytometer wird nur das Streulicht der Hauptstreurichtungen gemessen, das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter (FSC)) und das Seitwärtsstreulicht (side scatter (SSC)). Letzteres misst man im Winkel von 90° zum einfallenden Lichtstrahl.

Fluoreszierende Farbstoffe haben die Eigenschaft, dass ihre Elektronen durch Licht bestimmter Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Diese Elektronen kehren nach Beendigung des Lichteinfalls auf ihr Ausgangsenergieniveau zurück. Dabei verlieren sie Energie in Form von Licht. Dieses emittierte Licht ist jedoch langwelliger als das absorbierte. Ursache dafür ist ein geringer Energieverlust in Form von Wärme (58, 66).

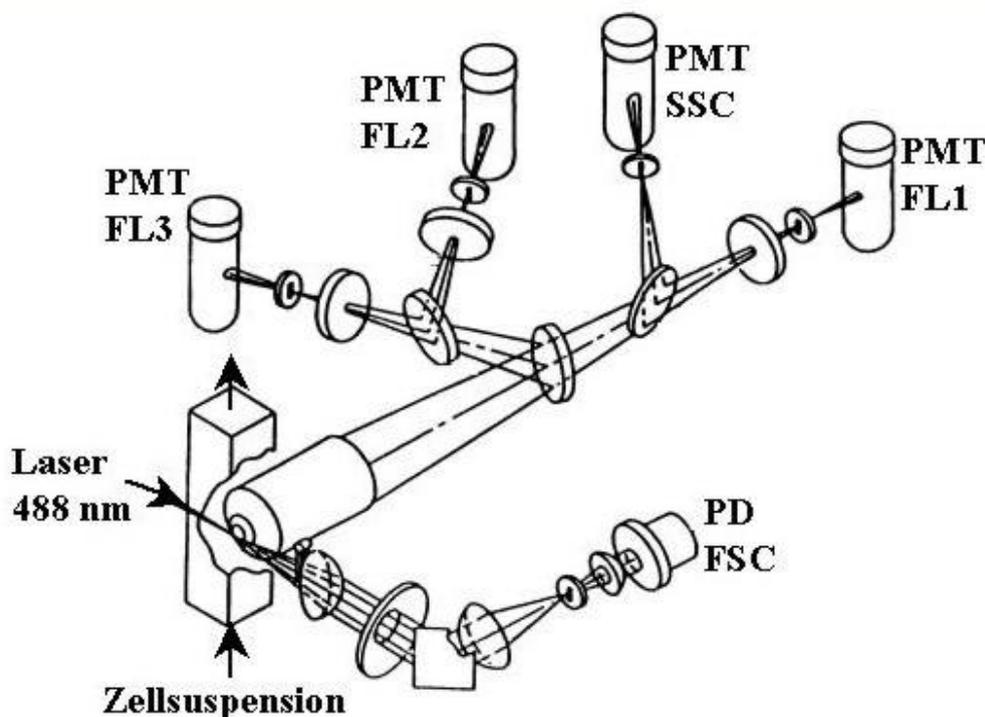
Bei der vorliegenden Arbeit wurde als Lichtquelle ein luftgekühlter Argonlaser verwendet, dessen Licht eine Wellenlänge von 488 nm besaß. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde

Propidiumjodid (Calbiochem-Novabiochem GmbH) eingesetzt. Dieser Farbstoff eignet sich für die Untersuchungen, weil er Energie des Lichtes der Wellenlänge des Argonlasers (488 nm) absorbiert. Bei Propidiumjodid handelt sich um eine nicht membranpermeable Substanz, welche unbehandelte und intakte Chondrozyten nicht anfärbt. Es bindet sich jedoch an die DNA der Chondrozyten mit Membrandefekten. Propidiumjodid kann somit u.a. der Unterscheidung der toten von der lebenden Zelle während der Fluoreszenzmessung dienen. Es hat seine Absorptionsmaxima bei 350 nm und 536 nm. Sein Fluoreszenzmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 611 nm. Die Fluoreszenzmessung von Propidiumjodid erfolgte bei 585 nm.

Da der als Lichtquelle verwendete Argonlaser eine Wellenlänge von 488 nm besitzt, die Absorptionsmaxima jedoch für Propidiumjodid bei 350 nm sowie 536 nm liegen, ist dessen Fluoreszenzintensität abgeschwächt. Für die durchgeführten Messungen wurde eine ausreichende Fluoreszenzausbeute erzielt.

Die gemessene Fluoreszenzintensität sowie das gemessene Streulicht jeder Einzelzelle wurden über einen Sekundärelektronenvervielfacher und einen Analog-Digital-Wandler in digitale Signale transformiert und mittels eines Computers gespeichert und weiterverarbeitet.

Abb. 3: Schematische Darstellung vom Aufbau des Durchflusszytometers (FACS)



2.3.2 Bestimmung des Membranpotentials humaner Chondrozyten

Die Bestimmung und Charakterisierung des Chondrozyten-Membranpotentials wurde an humanen nativen sowie an in vitro kultivierten Chondrozyten durchgeführt. Diese Chondrozyten wurden in Lösungen inkubiert, deren genaue Ionenkonzentration bekannt war und die sich ausschließlich in der K^+ -Konzentration unterschieden (vgl. Tab. 3). Neben den verschiedenen Elektrolyten enthielten die Lösungen das Ionophor Valinomycin und den Fluoreszenzfarbstoff Oxonol VI. Durch Valinomycin wird die Zellmembran für K^+ permeabel. Oxonol VI ist ein bis-Oxonol und wird im Zytoplasma depolarisierter Zellen akkumuliert [129, 160].

Tab. 3: Zusammensetzung der Ionenlösung für die durchflusszytometrische Charakterisierung des Membranpotentials (pH = 7,4; eingestellt mit KOH)

Substanz	Konzentration [mmol/l]	Hersteller
Hepes	10,0	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Glucose	10,0	Sigma, Deisendorf, Deutschland
MgCl ₂	0,5	Sigma, Deisendorf, Deutschland
CaCl ₂	0,3	Sigma, Deisendorf, Deutschland
KCl	1; 3; 5; 8; 10; 15; 20; 25; 30; 37,5; 60; 75; 90; 120 oder 150	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Valinomycin	0,005	Molecular Probes, Leiden, Holland
Oxonol VI	0,002	Molecular Probes, Leiden, Holland

Primär wurden die Chondrozyten für 5 min. in der Lösung mit 150 mmol/l KCl (Tab. 3) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 2 min. bei 1500 U/min. zentrifugiert und in einer Lösung mit gleicher bzw. geringerer Kaliumionenkonzentration resuspendiert (Tab. 3). Anschließend erfolgte umgehend die durchflusszytometrische Analyse der Zellen durch Bestimmung der membranpotentialabhängigen Fluoreszenzintensität von Oxonol VI für die jeweiligen Kaliumlösungen innerhalb der folgenden 5 min. bei ca. 70.000 Zellen pro Versuchsansatz. Als Kontrolle wurden humane Chondrozyten in einer Hepes-Lösung unter Zusatz von 5,4 mmol/l KCl, einer CaCl₂-Konzentration entsprechend dem Kulturmedium sowie dem Fluoreszenzfarbstoff Oxonol VI, jedoch ohne Zusatz des Ionophors Valinomycin verwandt.

2.3.3 Einfluss verschiedener Ionenkanalmodulatoren auf das Membranpotential

Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf das Chondrozyten-Membranpotential wurde an nativen, frisch isolierten, humanen Chondrozyten nach Inkubation mit verschiedenen Ionenkanalmodulatoren unterschiedlicher Konzentration bestimmt. Die Inkubation der Chondrozyten erfolgte dabei in einem Medium folgender Zusammensetzung:

- 10 mmol/l Hepes
- 10 mmol/l Glucose
- 0,5 mmol/l $MgCl_2$
- 0,3 mmol/l $CaCl_2$
- 5,4 mmol/l KCl

Zusätzlich enthielt dieses Medium jeweils einen Ionenkanalmodulator unterschiedlicher Konzentration (Tab. 4). Die Membranpotentialänderung im Vergleich zur Kontrolle wurde wiederum mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Oxonol VI und der Durchflusszytometrie bestimmt.

Tab. 4: Ionenkanalmodulatoren

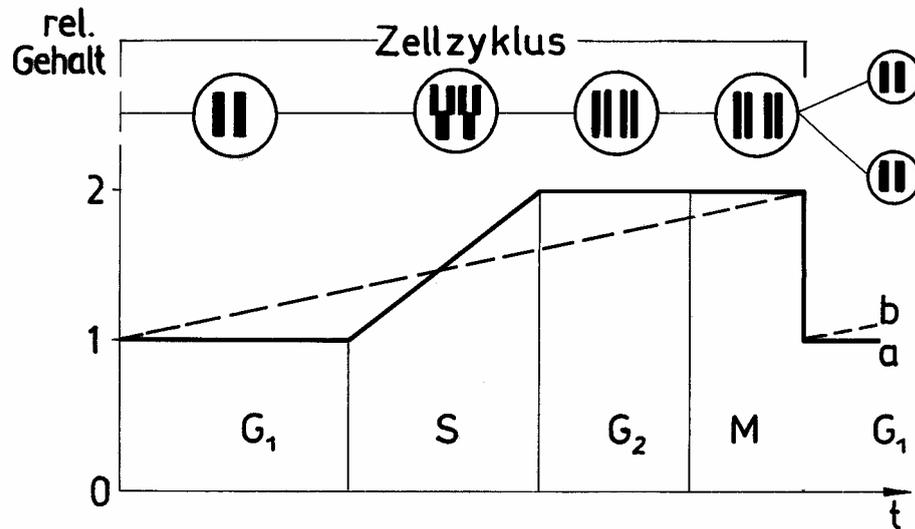
Ionenkanal-modulator	Konzentration [mmol/l]	Funktion	Hersteller
Lidocain	0,1 / 0,2	Natriumkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
4-Aminopyridin (4-AP)	1 / 2	Kaliumkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure (SITS)	0,25 / 0,5	Chlorid-u. Anionenkanalblocker	Sigma GmbH, Deisendorf, Deutschland
Verapamil	0,25 / 0,5	Calciumkanalblocker	ICN-Biomedicals Inc. Aurora / Ohio, USA

2.3.4 Bestimmung der DNA-Verteilungsmuster humaner Chondrozyten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die prozentuale Verteilung einer Zellpopulation in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu ermitteln. Hierzu wird der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen bestimmt. Entsprechend dem gemessenen DNA-Gehalt erfolgt eine Zuordnung zu der G₀/G₁-, der S- oder der G₂/M-Phase des Zellzyklus. Anschließend wird der prozentuale Anteil der einer Phase zugeordneten Zellanzahl auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen berechnet (Abb. 4).

Die Chondrozyten wurden entsprechend der jeweiligen Fragestellung unter Zusatz unterschiedlicher Testsubstanzen kultiviert. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes und der prozentualen Zellzyklusphasenverteilung humaner Chondrozyten erfolgte nach Ablösung der Zellen von den Kulturgefäßen eine Fixierung von $0,5 \times 10^6$ Zellen in 0,5 ml PBS durch Zusatz von 4,5 ml 80%-igem Ethanol über Nacht. Anschließend wurde die Markierung der Chondrozyten-DNA unter Verwendung des CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, San Jose, USA) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid vorgenommen. Die Fluoreszenzintensität, welche proportional dem DNA-Gehalt ist, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert, die prozentuale Verteilung der Zellen entsprechend der einzelnen Peaks berechnet und grafisch dargestellt.

Abb. 4: Schema der Zuordnung proliferierender Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen entsprechend dem relativen DNA-Gehalt (a) und dem relativen Proteingehalt (b) (modifiziert nach Arnold et al. [10])



2.4 Bestimmung der Chondrozytenproliferation

Zur Messung der Proliferation wurde eine Suspension aus Chondrozyten und Medium hergestellt, die ca. 50000 Zellen / ml enthielt. Als Kulturgefäße wurden 24-well Platten (Greiner) verwendet, die aus 24 Einzelkammern (Wells) mit jeweils 1,75 cm² Wachstumsfläche und einem Volumen von 2,9 ml bestanden. In jede dieser Kammern wurde 1 ml der Suspension (also 50000 Zellen) eingebracht und bei 37,0°C sowie 5% Kohlendioxid 3, 6, 9, 12, 15, 18 bzw. 21 Tage kultiviert. Anschließend wurde zu der Zellsuspension jeder Kammer 20 µl [³H-methyl]-Thymidin (spezifische Aktivität 60,3 Ci/mmol; American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA) gegeben. Dieses wird statt der Base Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die gemessene Radioaktivität ist somit ein Maß für die DNA-Syntheseleistung der untersuchten Zellen, also ein Maß für deren Proliferationsrate. Als Ausgangswert wurde der ³H-Thymidineinbau in frisch isolierten Zellen benutzt [119, 160].

Zwei Stunden nach ³H-Thymidinzugabe wurde das Medium aus den Kammern mit Hilfe eines Cell Harvesters (Berthold GmbH, Bad Wildbad) abgesaugt. Die Ablösung der Zellen von den Gefäßwänden erfolgte unter Zugabe von 200 µl Trypsin 0,05%. Nach 20 min. wurde die Suspension aus Trypsin 0,05% und Zellen wiederum mit dem Zell Harvester abgesaugt. Die Filterpapiere mit den zurückgehaltenen Zellen konnten nun in kleine Plastikröhrchen überführt werden. Diese wurden mit je 3 ml Szintillatorflüssigkeit (Ultima Gold) aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität der Zellen (Wallac 1410 Liquid Scintillation Counter, Pharmacia Wallac Oy, Turku, Finnland).

Um das Proliferationsverhalten von humanen Chondrozyten unter dem Einfluss verschiedener Ionenkanalmodulatoren beurteilen zu können, erfolgte ab dem ersten Mediumwechsel die Zugabe des in PBS gelösten Ionenkanalblockers in der entsprechenden Konzentration zum Kulturmedium. Der jeweiligen Kontrolle wurde nur die entsprechende Menge PBS zugesetzt.

2.5 Apoptose

2.5.1 Methodische Grundlagen

In der Zellbiologie werden verschiedene Formen des Absterbens von Zellen unterschieden. So lassen sich der programmierte Zelltod, Apoptose genannt, von einem zufälligen, als Nekrose bezeichneten Zelltod unterscheiden.

Die häufigste Form des Zelltodes ist die Nekrose. Sie läuft sehr schnell ab und wird durch außergewöhnliche physiologische Veränderungen oder aber durch extreme Zellschädigungen wie Hitze, Strahlung oder Viren verursacht. Die Nekrose ist keine Form des Zelltodes, der mit einer physiologischen Organentwicklung in Zusammenhang steht.

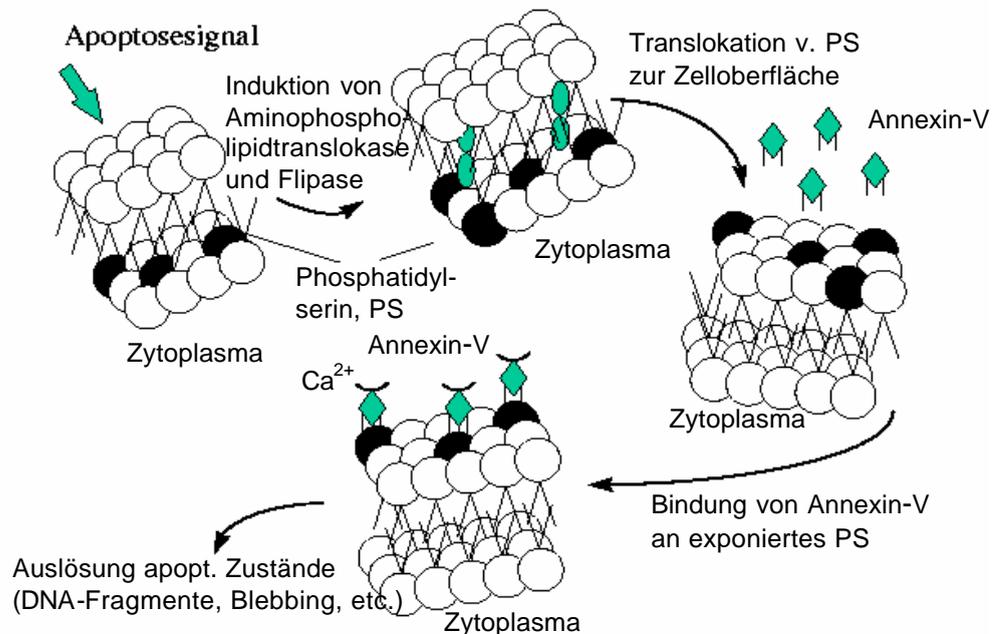
Die Apoptose dagegen ist ein physiologischer Prozess, der für die Aufrechterhaltung einer Homöostase innerhalb von Geweben, aber auch für den gesamten Organismus zwingend erforderlich ist. Sie ist ein aktiv gesteuerter Prozess, der zur gezielten Eliminierung einzelner Zellen dient. Die Einleitung der Apoptose kann über verschiedene Signalketten erfolgen. Einerseits werden Signale von Rezeptoren auf der Zellmembran empfangen (z.B. CD95/Fas, TNFR) und über verschiedene Caspasen zum Nukleus weitergeleitet. Andererseits können z.B. strahlungsbedingte Schädigungen der DNA auch auf direktem Wege zur Umstellung der Transkriptions- und Translationsaktivitäten der Zelle führen. Letztendlich ist das Resultat eine Aktivierung oder Neusynthese von Proteinen, die eine Veränderung der Zellmembran, DNA-Degradation und letztendlich eine Zerstörung der Zelle bewirken [149].

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden in den letzten Jahren verschiedene Nachweisverfahren entwickelt. Diese beruhen auf dem Nachweis von Veränderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und Transportfunktion der Plasmamembran, der Funktion von Zellorganellen, der DNA-Stabilität gegenüber Denaturierung oder aber der endonukleolytischen DNA-Fragmentierung. Durchflusszytometrische Messverfahren besitzen hierbei eine große Sensitivität und Spezifität und sind anderen Nachweisverfahren, wie beispielsweise immunhistochemischen Methoden, überlegen.

Etablierte durchflusszytometrische Nachweisverfahren der Apoptose sind der Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Assay), die Umlagerung von Phosphatidylserin (ANNEXIN V), der Nachweis des mitochondrialen Membranproteins Apo2.7 sowie die Caspaseaktivierung (Abb. 5) [170].

Aufgrund der Tatsache, dass nicht bei jedem Zelltyp und jedem bekannten Apoptosestimulus sämtliche beschriebenen Apoptosemarker nachweisbar sind, sollten zum Nachweis des programmierten Zelltodes immer mehrere Messverfahren gleichzeitig verwandt und deren Ergebnisse verglichen werden.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran (nach Riemschneider [119])



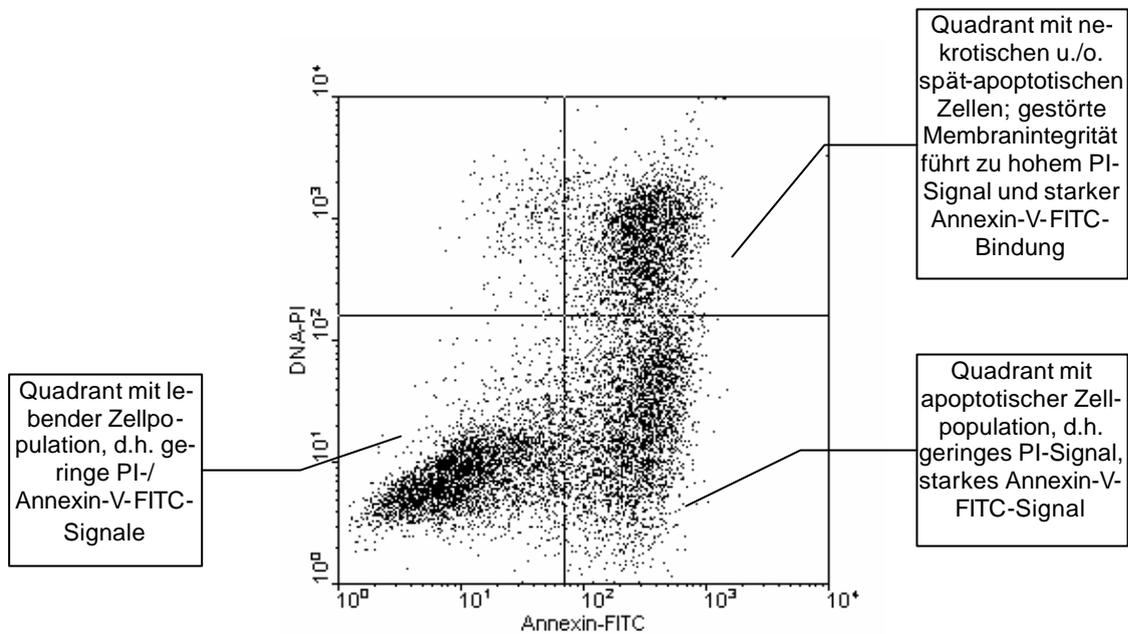
2.5.2 Nachweis der Translokation des Phosphatidylserins (Annexin V)

Bei intakten Zellen befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin nahezu ausschließlich auf der Innenseite der doppelschichtigen Zytoplasmamembran. Diese Polarität wird in einer sehr frühen Phase der Apoptose-Kaskade aufgehoben. In der Folge gelangt Phosphatidylserin auch an die Außenseite der Zytoplasmamembran [119].

Der Annexin V – Assay beruht auf dem Nachweis des Phosphatidylserins an der Zelloußenseite. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin. Voraussetzung für die Bindung ist allerdings eine geeignete Ca^{2+} -Konzentration (mindestens 2,5 mM). Über den Nachweis des gebundenen Annexin V können die apoptotischen Zellen dargestellt werden.

Zur Differenzierung von vitalen, apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen wird als zweiter Parameter die Interkalation von Propidiumjodid in die DNA untersucht. Propidiumjodid kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen. Somit zeigen vitale und apoptotische Zellen kein Fluoreszenzsignal für Propidiumjodid.

Abb. 6: Darstellung des Meßergebnisses der Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran mit gleichzeitiger PI-Färbung (flowzytometrische Zweiparametermessung) (nach Riemschneider [119])



2.5.3 Nachweis des Mitochondrienmembran-spezifischen Proteins Apo2.7

Während des Apoptoseprozesses kommt es zur Bildung des mitochondrialen Membranproteins Apo2.7. Es besitzt ein Molekulargewicht von 38 kD und wird auch als 7A6-Antigen bezeichnet. Seine Funktion ist bisher noch nicht geklärt. Der Klon 2.7A6A3 erkennt Apo2.7. Die Bindung des Apo2.7 Antikörpers korreliert mit dem Auftreten der DNA-Leiter in der Gelelektrophorese und Caspase-3 Aktivierung. Da es sich bei dem Apo2.7-Antigen um ein intrazelluläres Protein handelt, müssen die Zellen zur Detektion früher Apoptosephasen vor der Markierung mit dem Antikörper permeabilisiert werden. Zellen, bei denen die Apoptose bereits fortgeschritten ist bedürfen keiner Vorbehandlung, da hier die Zellmembran bereits desintegriert und für den Antikörper permeabel ist.

Nach einer für die entsprechende Fragestellung gewählten Inkubationszeit und dem Ablösen der Chondrozyten wurde diese nach dem in Tab. 6 beschriebenen Vorgehen weiterbehandelt [149].

Tab. 6: Arbeitsvorschrift zum Nachweis von Apo2.7 an unter in vitro Bedingungen kultivierten humanen Chondrozyten

Primärantikörper: Anti-Apo2.7-PE (Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich)
 Isotypkontrolle (DAKO Diagnostika GmbH, Mannheim)

Sekundärantikörper: medac M35001

- Chondrozyten liegen als Zellsuspension vor ($0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml) in PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3
- Überführen der Suspension in ein FACS-Röhrchen und für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren, ca. 100 μl Flüssigkeit belassen und Pellet aufklopfen
- 100 μl PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 +0,1% Tween 20 (Serva) zugeben und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 ml PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 zugeben und für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und ca. 50 μl Überstand belassen
- Pellet aufklopfen
- 10 μl anti-Apo2.7 bzw. der Isotypkontrolle zugeben und für 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Pellet aufklopfen
- Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers 2 ml PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 hinzufügen
- Für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren
- Pellet aufklopfen
- Pellet mit 0,5 ml PBS resuspendieren und am Durchflusszytometer vermessen

Zur Auswertung wurde der Bereich der Apo2.7-positiven Zellen markiert und der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellanzahl dargestellt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Programms WinMDI 2.7.

2.5.4 Nachweis der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18

M30 ist ein Antikörper, der an ein Caspase-geschnittenes, formalinresistentes Epitop des Zytokeratins 18 bindet. Dieses ist am nativen Zytokeratin 18 nicht detektierbar. Der Nachweis des Zytokeratins 18, der die Casapase-3 Aktivität bestimmt, ist ein späteres Ereignis der Apoptose. Dieses Messverfahren wurde für den Nachweis der Caspaseaktivität humaner Chondrozyten benutzt.

Nach einer für die entsprechende Fragestellung gewählten Inkubationszeit und dem Ablösen der Chondrozyten wurden diese entsprechend der Arbeitsvorschrift in Tab. 7 weiterbehandelt [149].

Tab. 7: Arbeitsvorschrift zum Nachweis der Casapaseaktivität am Zytokeratin 18 bei unter in vitro Bedingungen kultivierten humanen Chondrozyten

- Primärantikörper: Clon M30 anti Caspase cleavage product of CK 18
 - Sekundärantikörper: anti-mouse-Ig-fluorescein
- Für die Messungen wurde der M30 CytoDeath Kit (Boehringer Mannheim) verwendet.
- Chondrozyten liegen als Zellsuspension ($0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml) in PBS vor
 - Überführen der Suspension in ein FACS-Röhrchen und für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren
 - Überstand dekantieren, ca. 100 μ l Flüssigkeit belassen und Pellet aufklopfen
 - 1 ml Methanol (-20°C) unter sanftem Rühren eintropfen
 - Zellen für 30 min. bei 4°C fixieren
 - Für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren, Überstand dekantieren und restliches Methanol durch Abtropfen auf Filterpapier entfernen
 - Zum Permeabilisieren der Zellmembran 2 ml PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 + 0,1% Tween 20 (Serva) zugeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren
 - Für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
 - 10 μ l M30 antibody stock solution zugeben und bei Raumtemperatur 30 min. inkubieren
 - zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers werden 2 ml PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 zugegeben und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert

- erneut für 5 min. bei 1250 U/min. zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
- PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 + 0,1% Tween 20 (Serva) zugeben und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren 10 μl des Sekundärantikörpers zugeben und 30 min. im Dunkeln inkubieren
- zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers wird mit 2 ml PBS + 2% FKS (Biochrom) + 0,01% NaN_3 gewaschen
- Pellet mit 0,5 ml PBS-Lösung resuspendieren und am Durchflusszytometer vermessen.

Zur Auswertung wurde der Bereich der M30-positiven Zellen markiert und der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellanzahl dargestellt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Programms WinMDI 2.7.

2.6 Zelluläre Leistungen humaner Chondrozyten

2.6.1 Bestimmung der CD44-Expression

2.6.1.1 Grundlagen

Der CD44-Rezeptor ist an der Oberfläche der Zellmembran lokalisiert. Er ist ein Hyaluronsäure-bindendes, membraninterkalierendes Glycoprotein, welches mit Zytoskelettproteinen interagiert. Er ist an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt, so dass man von einer Zell-Matrix-, Matrix-Zell-Interaktion sprechen kann [2, 52, 63, 158]. Diese ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. CD44 besitzt eine hohe Affinität zur Hyaluronsäure. Geringere Affinitäten bestehen auch für Chondroitinsulfat und Heparansulfan [63, 158].

2.6.1.2 Bestimmung des CD44-Gehaltes humaner Chondrozyten

Der Nachweis des CD44-Membranproteins bei humanen Chondrozyten erfolgte flowzytometrisch durch Vergleich mit der Isotypkontrolle (ms-IgG1-FITC, Mouse IgG1, DAKO Diagnostika GmbH, Mannheim). Dabei wurde die Anzahl der merkmalttragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten CD44-Antikörpers (anti-CD44H-FITC, DAKO) aufgetragen.

Nach einer für die entsprechende Fragestellung gewählten Inkubationszeit und dem Ablösen der Chondrozyten wurden diese entsprechend der Arbeitsvorschrift in Tab. 8 weiterbehandelt [39].

Tab. 8: Arbeitsvorschrift zum durchflusszytometrischen Nachweis des CD44-Rezeptors an der Zellmembran humaner in vitro kultivierter Chondrozyten

- Antikörper: anti-CD44-FITC (Phagocytic Glycoprotein-1, CD44 / FITC) (DAKO)
- Isotypkontrolle: ms-IgG1-FITC (Mouse IgG1 / FITC) (DAKO)
- Nach Zellernte $0,5 \times 10^6$ Zellen in 0,5 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Biochrom)
- Für 2 min. mit 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und ca. 5 µl Flüssigkeit belassen
- Zellpellet aufklopfen

- Für die Kontrolle: 10µl ms-IgG1-FITC zugeben und für 30 min. im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Für die Probe: 5 µl anti-CD44-FITC zugeben und für 30 min. im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Waschen im 1ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Biochrom)
- Für 2 min. mit 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und ca. 5 µl Flüssigkeit belassen
- Zellpellet aufklopfen
- Waschen im 1ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Biochrom)
- Für 2 min. mit 1250 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und ca. 5 µl Flüssigkeit belassen
- Zellpellet aufklopfen
- 1 ml PBS zugeben

Im Anschluß wurden die Proben und entsprechende Kontrollen innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer (FL1-H) vermessen. Bis zur Messung wurden sie im Dunkeln gelagert.

2.6.2 Bestimmung der Synthese von Kollagen Typ I und Typ II

2.6.2.1 Methodische Grundlagen

Die extrazelluläre Knorpelmatrix nimmt einen erheblichen Anteil des Knorpelvolumens ein und bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Knorpelgewebes wesentlich. Sie besteht aus unterschiedlichen Proteinen und Polysacchariden, welche vom Chondrozyten selbst produziert und exprimiert werden.

In der extrazellulären Matrix werden zwei Hauptklassen von Makromolekülen unterschieden. Zur ersten Hauptklasse werden Glucosaminglykane gezählt. Hierbei handelt es sich um Polysaccharide, welche meist an Proteine gekoppelt sind und in Form von Proteoglycanen vorliegen. Die zweite Hauptgruppe wird durch Faserproteine, insbesondere durch Kollagene, gebildet. 95% der im physiologischen Knorpelgewebe vorkommenden Kollagene ist Kollagen Typ II. Es besteht aus drei gleichartigen $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten. Diese Polypeptidketten liegen in Helixformation vor und sind jeweils umeinander gewunden. Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch kovalente Quervernetzung mit Hilfe von Lysin- und Hydroxylysinresten. So entstandene Kollagenfibrillen haben einen Durchmesser von 10-300 nm und können viele μm lang sein.

Kollagenfasern sind auf Zugstabilität ausgerichtet und extrem belastbar. So hält eine 1mm starke Kollagenfaser einer Last von bis zu 10 kg stand.

Neben Kollagen Typ II kommen im physiologischen hyalinen Knorpelgewebe Kollagen Typ IX und XI vor [83]. Kollagenfibrillen in anderen Geweben enthalten gehäuft Kollagen Typ I, III und V [32, 65].

Während der in vitro-Kultivierung humaner Chondrozyten kommt es zur Dedifferenzierung der Zellen [45]. Diese Dedifferenzierung führt zu Veränderungen der Syntheseleistungen der Chondrozyten. So wird die Synthese des Kollagen Typ II eingestellt und es ist die Bildung von Kollagen Typ I nachweisbar [45]. Neben Chondrozyten zeigen auch Zellen aus Bandscheibengewebe ähnliche Veränderungen während der Kultivierung in Monolayer-Kultur [12].

Nach längerer Kulturdauer kommt es zu einer Redifferenzierung der Chondrozyten mit Wiederaufnahme der Kollagen Typ II-Synthese und einer Einstellung der Kollagen Typ I Produktion. Der Zeitpunkt der De- und Redifferenzierung ist von vielen Faktoren, insbesondere von den Kulturbedingungen, abhängig. In Monolayer-Kultur kultivierte Zellen dedifferenzieren früher und redifferenzieren später als Chondrozyten in 3D-Kultur [37, 45, 91].

2.6.2.2 Bestimmung des Gehaltes an Kollagen Typ I und Typ II

Der Nachweis der Kollagen Typen I und II an humanen Chondrozyten erfolgte durchflusszytometrisch durch Vergleich mit einer Isotypkontrolle. Dabei wurde die Anzahl der merkmalttragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten Antikörpers aufgetragen.

Nach einer für die Fragestellung entsprechenden Inkubationszeit und dem Ablösen der Chondrozyten vom Boden des Kulturgefäßes wurden diese entsprechend der Arbeitsvorschrift in Tab. 9 weiterbehandelt.

Tab. 9: Arbeitsvorschrift zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Gehaltes an Kollagen Typ I und II humaner in vitro kultivierter Chondrozyten

- Antikörper: anti-Collagen-Type-I (ms-IgG2a) (Oncogene, Vertrieb Calbiochem)
anti-Collagen-Type-II (ms-IgG1) (Oncogene, Vertrieb Calbiochem)
 - Sekundärantikörper: FITC-konjugiert goat-anti-ms-IgG2a (DAKO)
FITC-konjugiert goat-anti-ms-IgG1 (DAKO)
 - Isotypkontrolle: für Kollagen Typ I: ms-IgG2a (Mouse IgG1) (DAKO)
für Kollagen Typ II: ms-IgG1 (Mouse IgG1) (DAKO)
-
- Nach Zellernte $0,5 \times 10^6$ Zellen in 0,5 ml PBS
 - Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
 - Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
 - Fixieren mit 1 ml PBS + 2% Paraformaldehyd für 15 min. bei -2°C bis -8°C
 - Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
 - Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
 - Resuspendieren in 2 ml PBS
 - Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
 - Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
 - Resuspendieren in 2 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum + 0,12% Saponin
 - Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
 - Überstand dekantieren, 50 μl Flüssigkeit belassen und Zellpellet aufklopfen

- Für die Kontrolle: 10 µl ms-IgG2a, bzw. 10 µl ms-IgG1 zugeben und für 30 min. im Dunkeln inkubiert
- Für die Probe: 10 µl anti-Collagen-Type-I oder 10 µl anti-Collagen-Type-II zugeben und für 30 min. im Dunkeln inkubieren
- Waschen im 2 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Sigma)
- Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
- Waschen im 2 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Sigma)
- Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen, 50 µl Flüssigkeit belassen
- 2 µl FITC-konjugierter Sekundärantikörper (goat-anti-ms-IgG2a oder goat-anti-ms-IgG1) zugeben und für 30 min. im Dunkeln inkubieren
- Waschen im 2 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Sigma)
- Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
- Waschen im 2 ml PBS + 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (Sigma)
- Für 2 min. mit 1300 U/min. zentrifugieren
- Überstand dekantieren und Zellpellet aufklopfen
- 1 ml PBS zugeben

In Anschluß wurden die Proben und die entsprechenden Kontrollen innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer vermessen. Bis zur Messung wurden sie im Dunkeln gelagert.

2.7 Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Software SigmaStat V. 1.0 für Windows erstellt. Unterschiede wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant bewertet.

Es war zu untersuchen, ob unter der jeweiligen Einflussgröße statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Mittelwertgruppen vorhanden sind. Dazu wurden der Mittelwert als Maßzahl der mittleren Lage sowie die Standardabweichung als Maßzahl der Streuung berechnet und grafisch dargestellt.

Bei dem Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen miteinander, wurde der t-Test ausgewählt.

Sollen jedoch mehr als zwei Stichproben aus normalverteilten Populationen mit gleicher Varianz miteinander verglichen werden, so empfiehlt sich die Verwendung der Varianzanalyse als statistischer Test. Da jeweils nur ein Faktor in den Mittelwertgruppen untersucht wurde, eignete sich die Ein-Weg-Varianzanalyse (one-way-ANOVA).

Wenn mehrere unabhängige Gruppen auf statistische Signifikanz hin verglichen werden sollen, bietet sich die Verwendung des Kruskal-Wallis-Testes (H-Test) an. Es handelt sich dabei um einen nichtparametrischen Test, welcher verteilungsunabhängig die analogen Hypothesen der Ein-Weg-Varianzanalyse prüft. Im Kruskal-Wallis-Test werden zunächst die Beobachtungswerte der Größe nach rangiert. Anschließend werden die Rangwerte anstelle der Beobachtungswerte einer Varianzanalyse unterzogen [1, 123, 156].

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Membranpotentials humaner Chondrozyten

Zur Charakterisierung des Membranpotentials humaner Chondrozyten wurde initial eine Membranpotential-Eichkurve ermittelt. Hierzu wurden die in Extrazellulärlösung mit verschiedenen Kaliumionenkonzentration inkubierten Chondrozyten durchflusszytometrisch, unter Verwendung des membranpotentialabhängigen Farbstoffes Oxonol VI, vermessen (Tab. 3). Durch die Änderung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration diffundieren verstärkt Kaliumionen entlang dem Konzentrationsgefälle durch die Zellmembran. Dieser ungehinderte Ionenstrom durch die Zellmembran wird möglich, da diese durch Valinomycin für Kaliumionen permeabel wurde. Nach Ausgleich der intra- und extrazellulären Kaliumionenkonzentration stellt sich ein neues Gleichgewichtspotential über der Zellmembran ein. Diesem neuen Gleichgewichtspotential entsprechend, ändert Oxonol VI seine Fluoreszenzintensität. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wird durchflusszytometrisch gemessen. Die Abb. 7 zeigt ein Beispiel für die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Änderung der jeweiligen extrazellulären Kaliumionenkonzentration.

Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde unter Kenntnis der exakten Ionenverteilung mit Hilfe der NERNST'schen Gleichung:

$$E = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \frac{[x]_e}{[x]_i}$$

E.....Membranpotential	z.....Ladung des Ions x
R.....spezifische Gaskonstante	[x] _eextrazelluläre Konzentration des Ions x
T.....Temperatur in Kelvin	[x] _i intrazelluläre Konzentration des Ions x
F.....Faraday-Konstante	

die entsprechenden Membranpotentiale berechnet.

Abb. 7: Beispiel für die zeitabhängige Veränderung der durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensität von Oxonol VI bei humanen Chondrozyten nach Änderung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration [mmol/l]

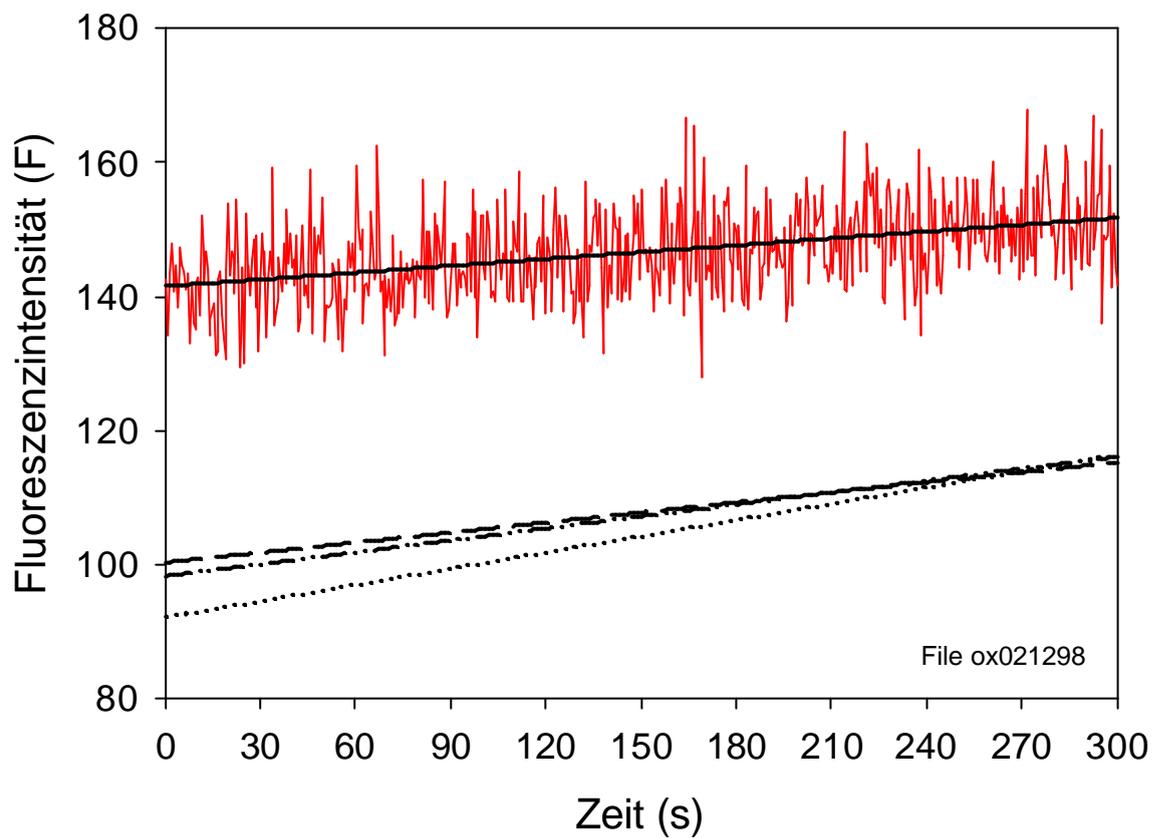
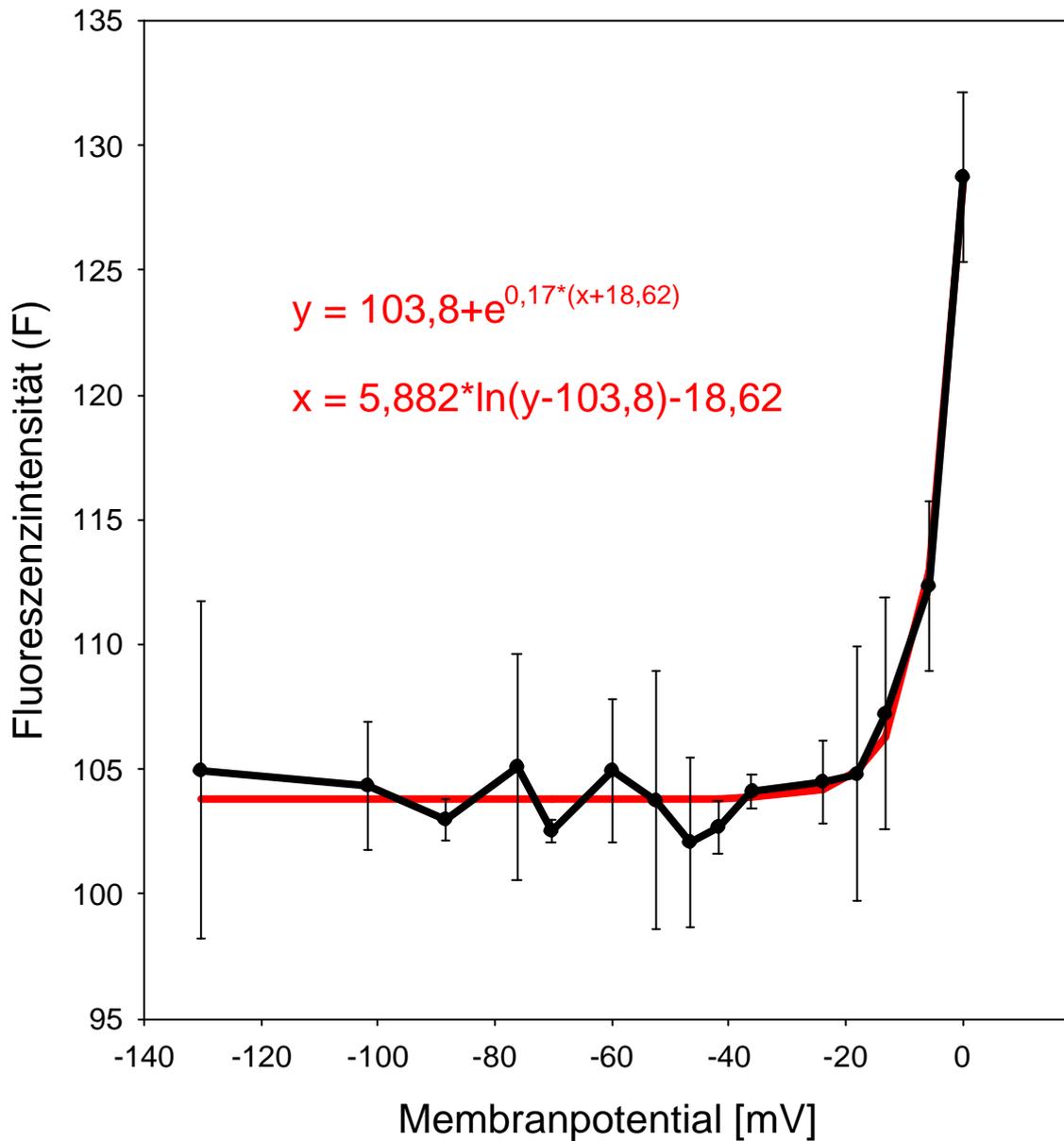


Abb. 8: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung des Membranpotentials nativer humaner Chondrozyten mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Oxonol VI und des Ionophors Valinomycin (N=10)



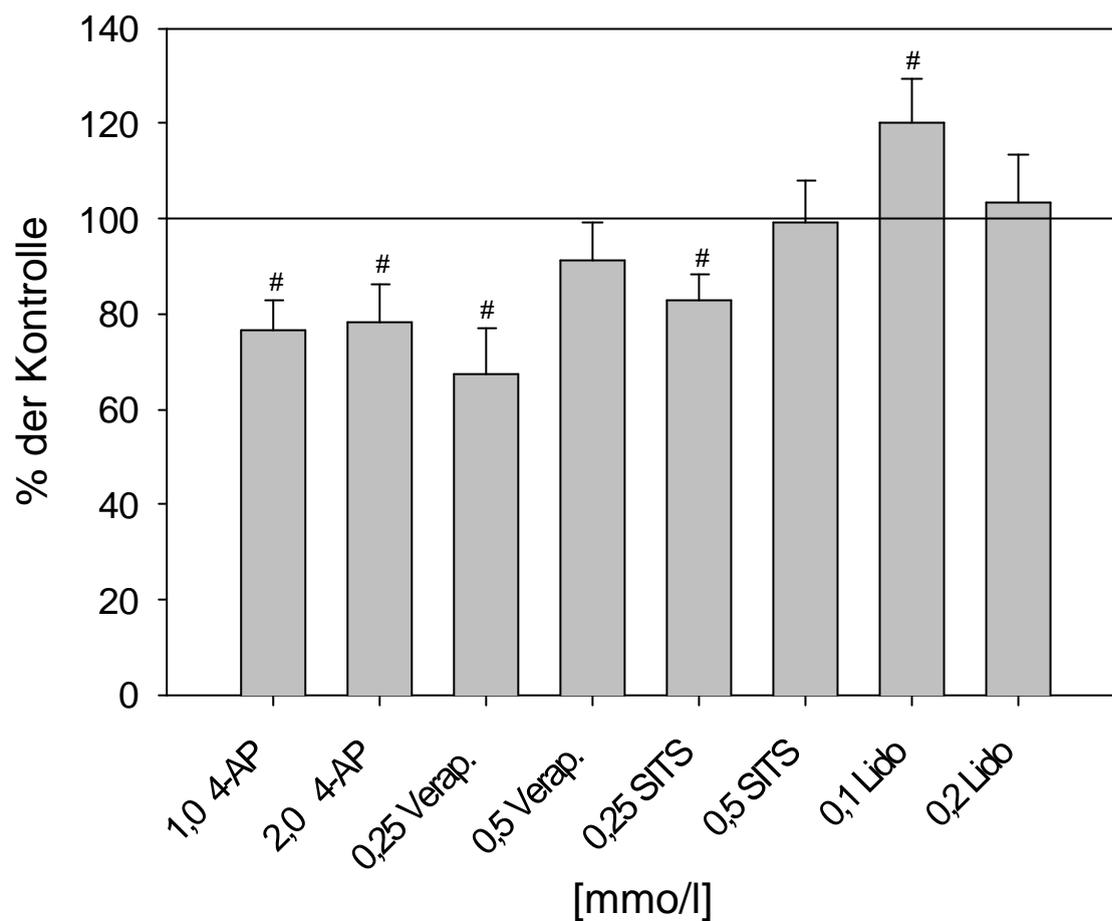
An die Meßwerte dieser Eichkurve wurden die Parameter einer Exponentialfunktion angepaßt. Mit dieser mathematischen Funktion war es möglich, für jeden gemessenen Fluoreszenzwert das entsprechende Membranpotential annähernd zu errechnen. Die Meßergebnisse sowie deren mathematische Funktion sind in Abb. 8 dargestellt.

3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Beeinflussung des Membranpotentials humaner Chondrozyten durch Ionenkanalmodulatoren

Zur Untersuchung des konzentrationsabhängigen Einflusses von Ionenkanalmodulatoren auf das Membranpotential wurden Lidocain, 4-Aminopyridin (4-AP), 4-Acetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Disulfonsäure Stilben (SITS) und Verapamil verwendet.

Die Blockade von Kaliumkanälen mit 4-AP in einer Konzentration von 1 bzw. 2 mmol/l führte zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität und damit zu einer Reduzierung des Membranpotentials. Konzentrationsabhängige Unterschiede zeigten sich hierbei jedoch nicht. Diese Effekte konnten auch unter dem Einfluss von 0,25 mmol/l Verapamil sowie bei 0,25 mmol/l SITS beobachtet werden. Die Na⁺-Kanalblockade durch Lidocain führte bei einer Konzentration von 0,1 mmol/l zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität und somit zur Erhöhung des Membranpotentials an der Zellmembran humaner Chondrozyten (Abb. 9).

Abb. 9: Verhalten der Fluoreszenzintensität von Oxonol VI bei nativen humanen Chondrozyten unter dem konzentrationsabhängigen Einfluss verschiedener Ionenkanalmodulatoren (N=12) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (=100%), $p < 0,05$)



3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der DNA-Verteilungsmuster humaner Chondrozyten

Die Auswertung der Ergebnisse zum DNA-Verteilungsmuster humaner Chondrozyten zeigt, dass sich ca. 95% der untersuchten Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befinden und lediglich 1% der S-Phase sowie 4% der G₂/M-Phase zuzuordnen sind. In Abb. 10 ist ein Beispiel der DNA-Verteilung einer Chondrozytenpopulation dargestellt. Neben der DNA-diploiden Stammlinie ist ein tetraploider Verdopplungsgipfel bei einem DNA-Index (DI)=2,0 erkennbar. Die Zusammenfassung der Meßergebnisse aller Untersuchungen zeigt nach Auswertung der Verteilung der Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen eine sehr geringe Streuung der Chondrozytenpopulationen bei unterschiedlichen Spendern. In der Abb. 11 sind die Ergebnisse aller Untersuchungen zusammengefaßt grafisch dargestellt.

Abb. 10: Beispiel der durchflusszytometrisch bestimmten DNA-Verteilung einer nativen humanen Chondrozytenpopulation

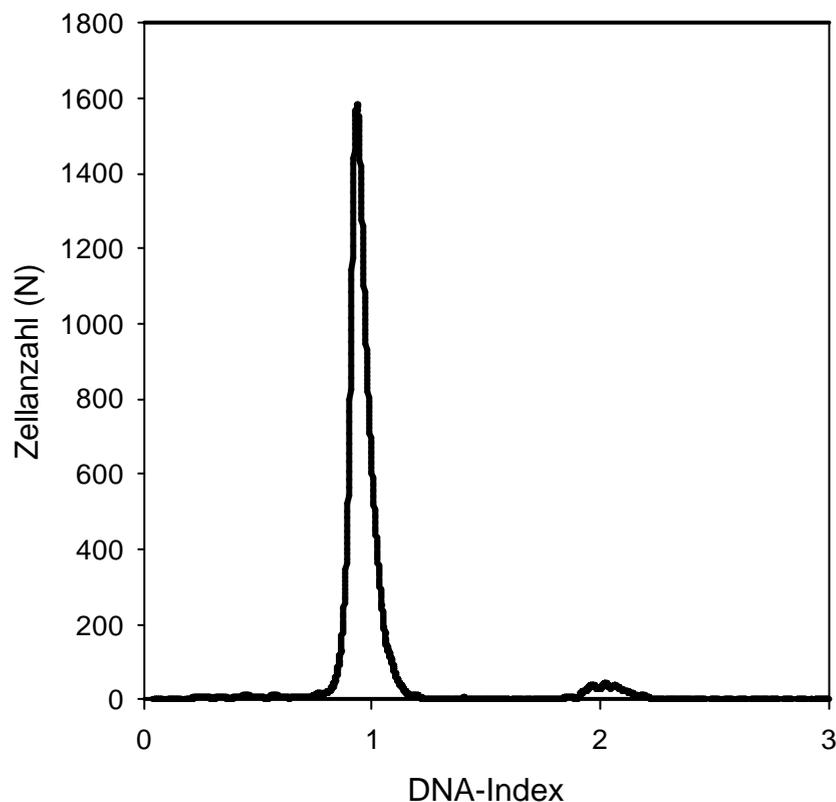
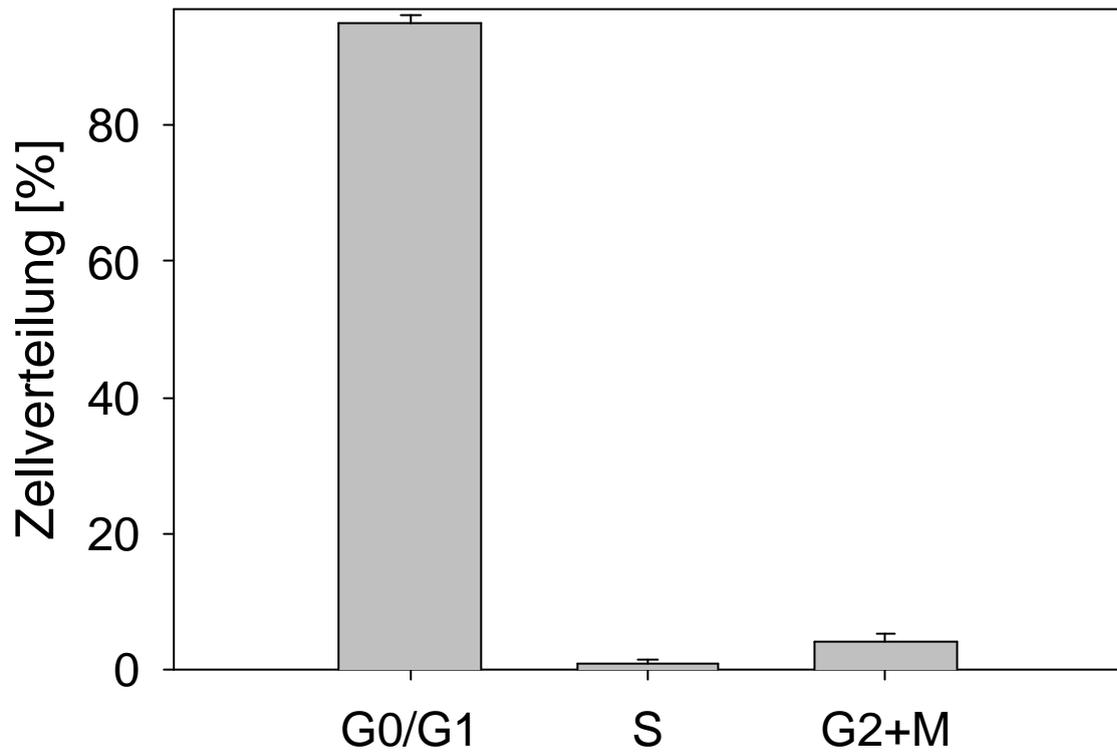


Abb. 11: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung nativer humaner Chondrozyten (N=11)



3.4 Bestimmung der Chondrozytenproliferation mit ^3H -Thymidin

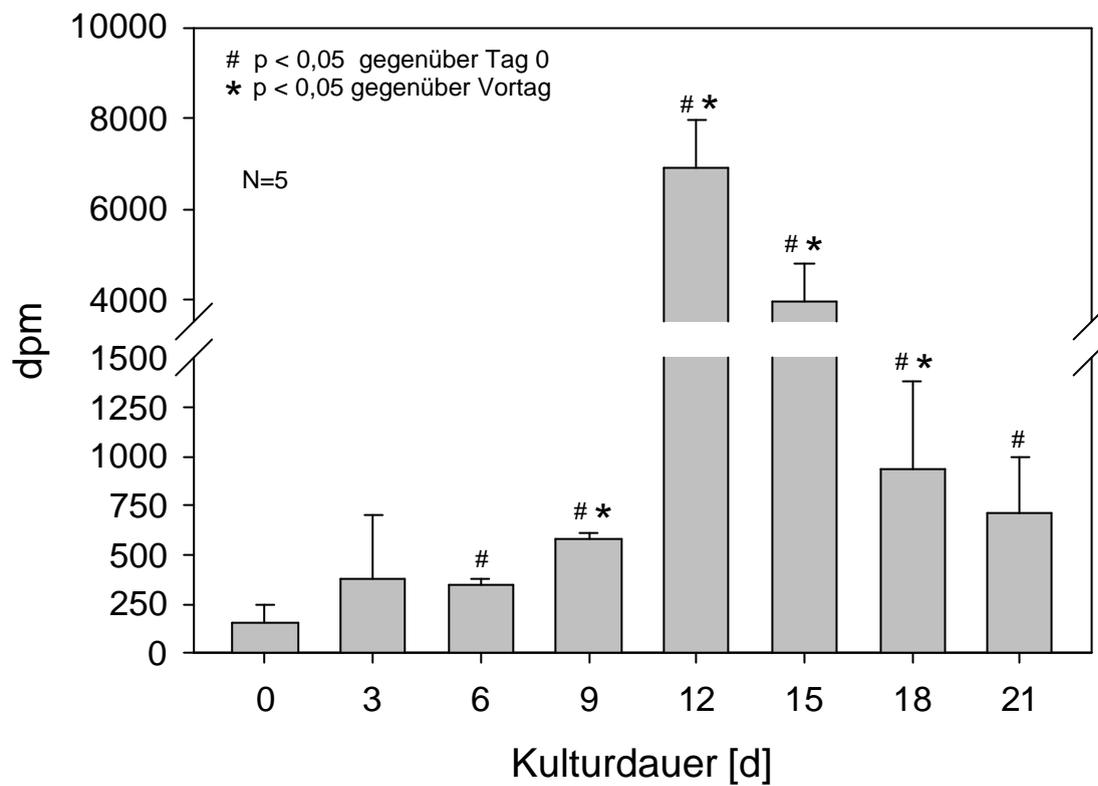
Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf das Proliferationsverhalten der Chondrozyten zu untersuchen, wurde zunächst das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit von der Wachstumszeit bestimmt.

Als Maß für die Proliferation wurde der ^3H -Thymidineinbau gemessen [46, 55, 98, 100].

Bei den Messungen der Einbaurrate von ^3H -Thymidin in Chondrozyten in Abhängigkeit von der Kulturdauer konnte bereits am 6. Kulturtag ein gegenüber den Ausgangswerten erhöhter ^3H -Thymidineinbau nachgewiesen werden, der am 12. Kulturtag ein Maximum erreichte (Abb. 12). Im weiteren Kulturverlauf ließ sich ein Absinken der Proliferationsrate beobachten, wobei aber auch noch nach 21 Kulturtagen eine im Vergleich zu den Ausgangswerten erhöhte ^3H -Thymidineinbaurrate gemessen wurde. Am 12. Kulturtag ist ein Anstieg des ^3H -Thymidineinbaus um den Faktor 11,8 gegenüber dem Vortag nachweisbar (Abb. 12).

Die statistische Überprüfung der gemessenen Werte ergab eine signifikante Änderung im Proliferationsverhalten der Chondrozyten vom 6. bis zum 21. Kulturtag im Vergleich zu den Werten am Tag des Kulturbeginns. Eine statistisch signifikante Steigerung der Proliferation im Vergleich zum Vortag wurde am 9. und 12. Kulturtag gemessen. Eine statistisch signifikante Abnahme der Proliferation im Vergleich zum Vortag konnte am 15. und 18. Kulturtag festgestellt werden (Abb. 12).

Abb. 12: Mittlere Einbaurrate von ^3H -Thymidin in humane Chondrozyten in Abhängigkeit der Kulturdauer. Messwerte in dpm. N=5.



3.5 Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Proliferation humaner Chondrozyten

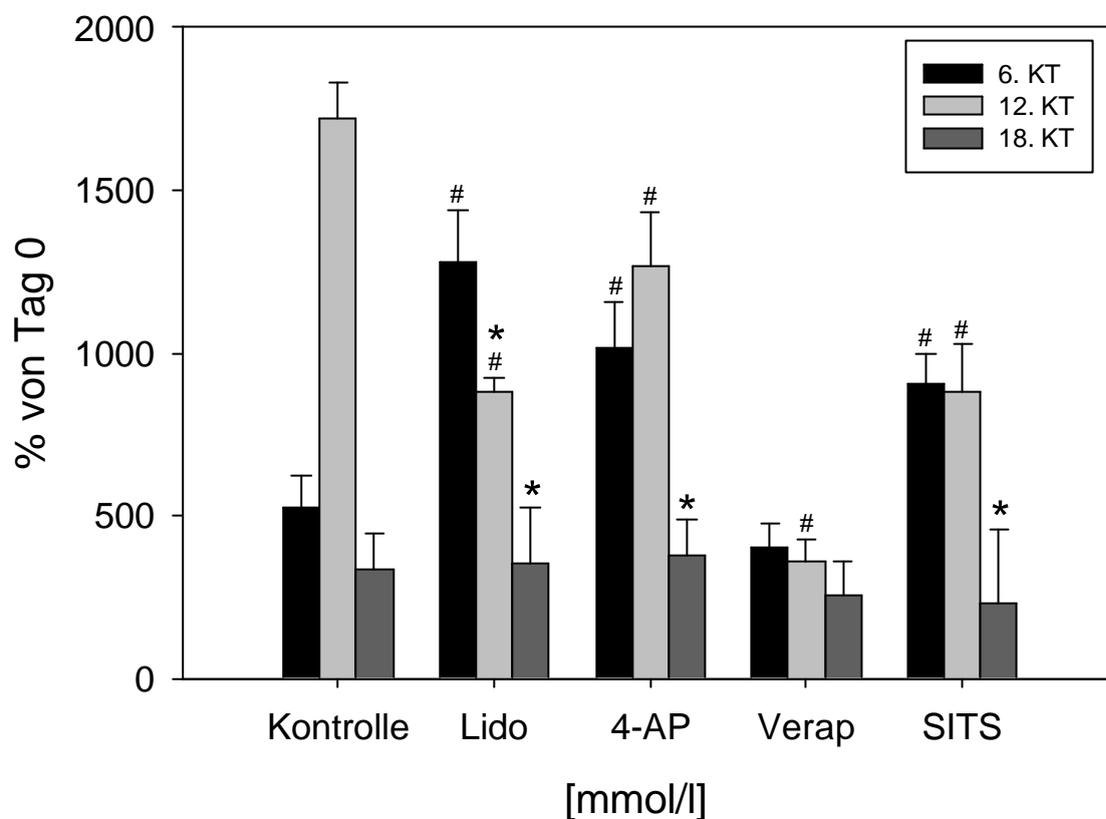
In Anlehnung an die bekannten Reaktionen anderer Zellsysteme interessiert der Einfluss der Ionenkanalblocker auf das Proliferationsverhalten von Chondrozyten. Dazu wurde den sich in Kultur befindenden Chondrozyten beim ersten Mediumwechsel am 2. Kulturtag jeweils einer von vier verschiedenen Ionenkanalmodulatoren zugegeben und ihr Proliferationsverhalten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe am 6., 12. oder 18. Kulturtag mit Hilfe des ^3H -Thymidineinbaus gemessen (Abb. 13).

Die unter dem Einfluss des Na^+ -Kanalblockers Lidocain, des K^+ -Kanalblockers 4-AP sowie des Cl^- - und Anionenkanalhemmers SITS kultivierten humanen Chondrozyten zeigten am 6. Kulturtag eine deutliche Steigerung der Proliferation. Im Vergleich dieser Substanzen untereinander war nach Lidocain-Zugabe die höchste Proliferationssteigerung nachweisbar. Diese proliferationssteigernden Effekte ließen sich nach 12 und 18 Kulturtagen bei keiner der genannten Substanzen mehr nachweisen (Abb. 13).

Die unter dem Calciumantagonisten Verapamil kultivierten Chondrozyten zeigten am 6. Kulturtag keine Änderung des Proliferationsverhaltens (Abb. 13).

Bei allen vier Ionenkanalmodulatoren konnte die in der Kontrollgruppe gemessene deutliche Zunahme der Proliferation am 12. Kulturtag nicht nachgewiesen werden. Am 18. Kulturtag bestanden keine Unterschiede zwischen den Messwerten der unbehandelten Kontrolle und den unter den Ionenkanalmodulatoren kultivierten Chondrozyten (Abb. 13).

Abb. 13: Einbau von ^3H -Thymin in in vitro kultivierte humane Chondrozyten unter dem Einfluss von 0,1 mmol/l Lidocain, 1,0 mmol/l 4-AP, 0,08 mmol/l Verapamil oder 0,25 mmol/l SITS nach unterschiedlicher Kulturdauer. Zugabe des Ionenkanalblockers am 2. Kulturtag. Meßwerte in dpm. (N=5) (# signifikant im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,05$) (* signifikant im Vergleich zum Vortag, $p < 0,05$)



3.6 Apoptose

Durchflusszytometrisch wurde anhand verschiedener Apoptosemarker der Einfluss der Ionenkanalblocker Verapamil, 4-AP, Lidocain und SITS auf die Induktion des programmierten Zelltodes untersucht. Es sollte geprüft werden, ob und in welchem Umfang diese Ionenkanalmodulatoren im Zusammenhang mit solchen Prozessen stehen und wie sich deren zeitlicher Verlauf gestaltet.

3.6.1 Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin (Annexin V)

Verapamil

Bei unter dem Einfluss von Verapamil (0,1; 0,25; 0,5; 1 mmol/l) kultivierten Chondrozyten ließen sich bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h apoptotische Ereignisse nachweisen. Insbesondere zeigte sich mit zunehmender Verapamilkonzentration eine signifikante Abnahme der vitalen Zellpopulation in Verbindung mit einem deutlichen Anstieg des spätapoptotisch/nekrotischen Zellanteils. Dieser erhöhte sich auf mehr als 50% der untersuchten Zellanzahl bei einer Verapamil-Konzentration von 1 mmol/l (Abb. 15)

Nach 48 h Inkubationszeit sind zunehmend apoptotische Prozesse zu beobachten, die bei einer Verapamil-Konzentration von 0,25 mmol/l ein Maximum zeigten. Die Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen für 0,5 bzw. 1 mmol/l wird bedingt durch den Übergang der Zellen in das Stadium der Spätapoptose / Nekrose, welches bereits nahezu 75% der gesamten Zellpopulation umfaßt (Abb. 16).

Abb. 14: Durchflusszytometrische Messung von humanen Chondrozyten (Zwei-Parameter-Färbung mit Annexin-V-FITC und PI nach Exposition mit Verapamil für 24 h bzw. 48 h (von oben nach unten: unbehandelte Kontrolle; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM)).

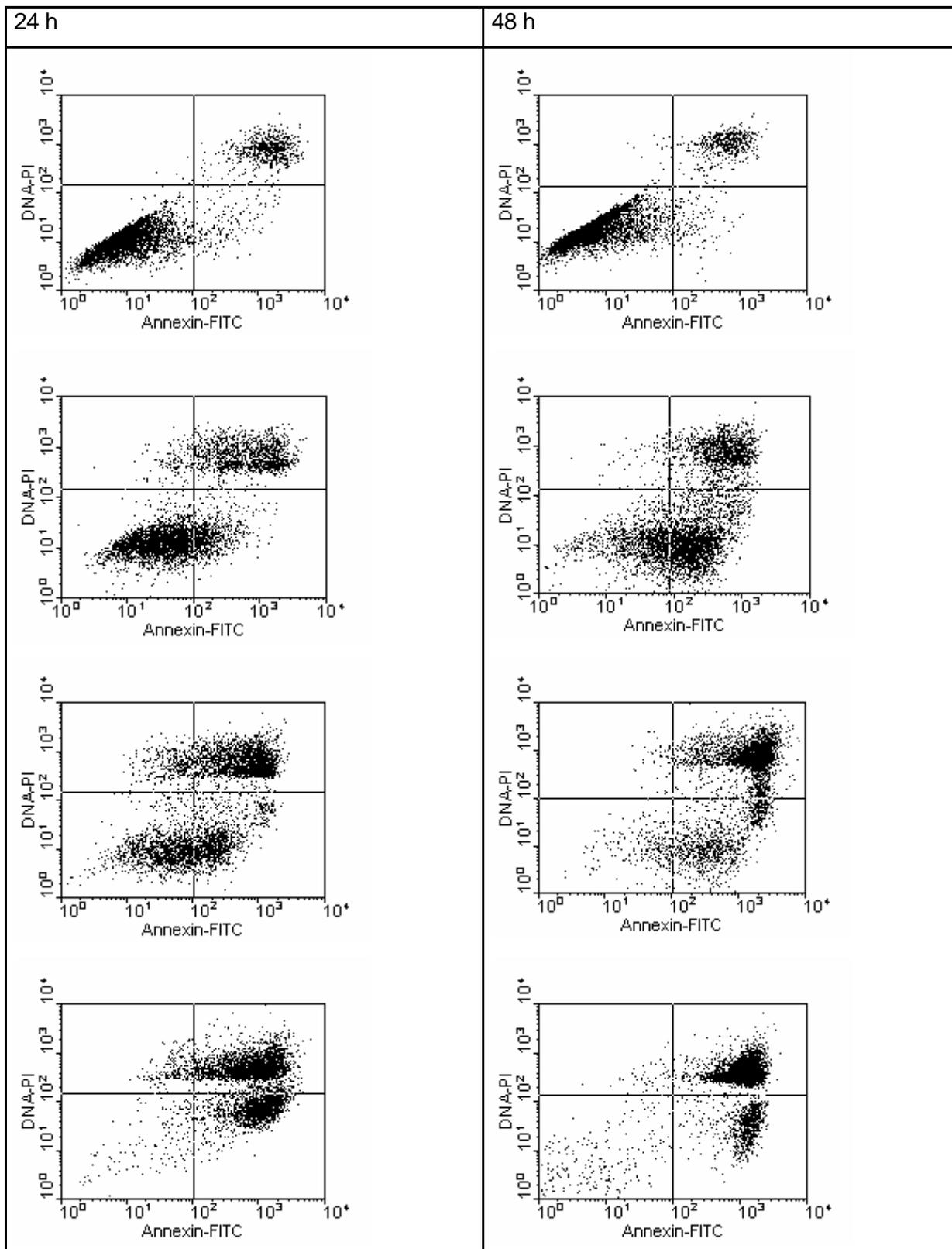


Abb. 15: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **24 h Exposition mit Verapamil** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)

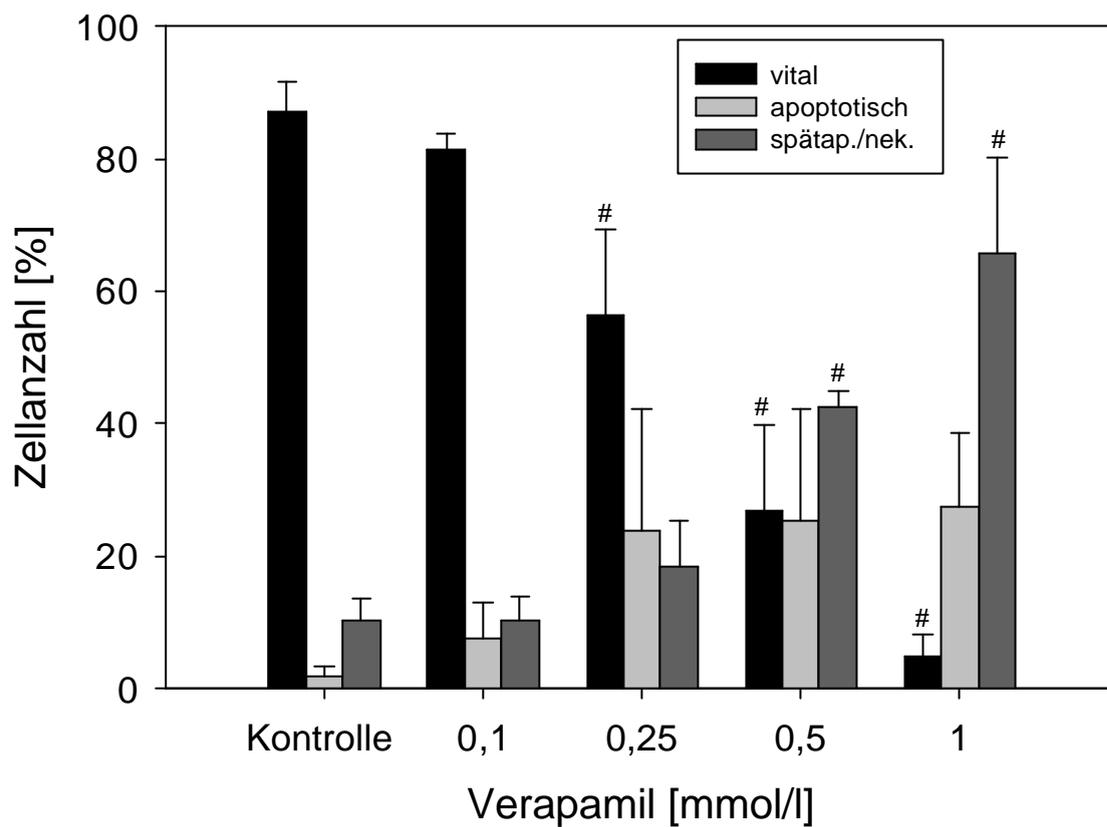
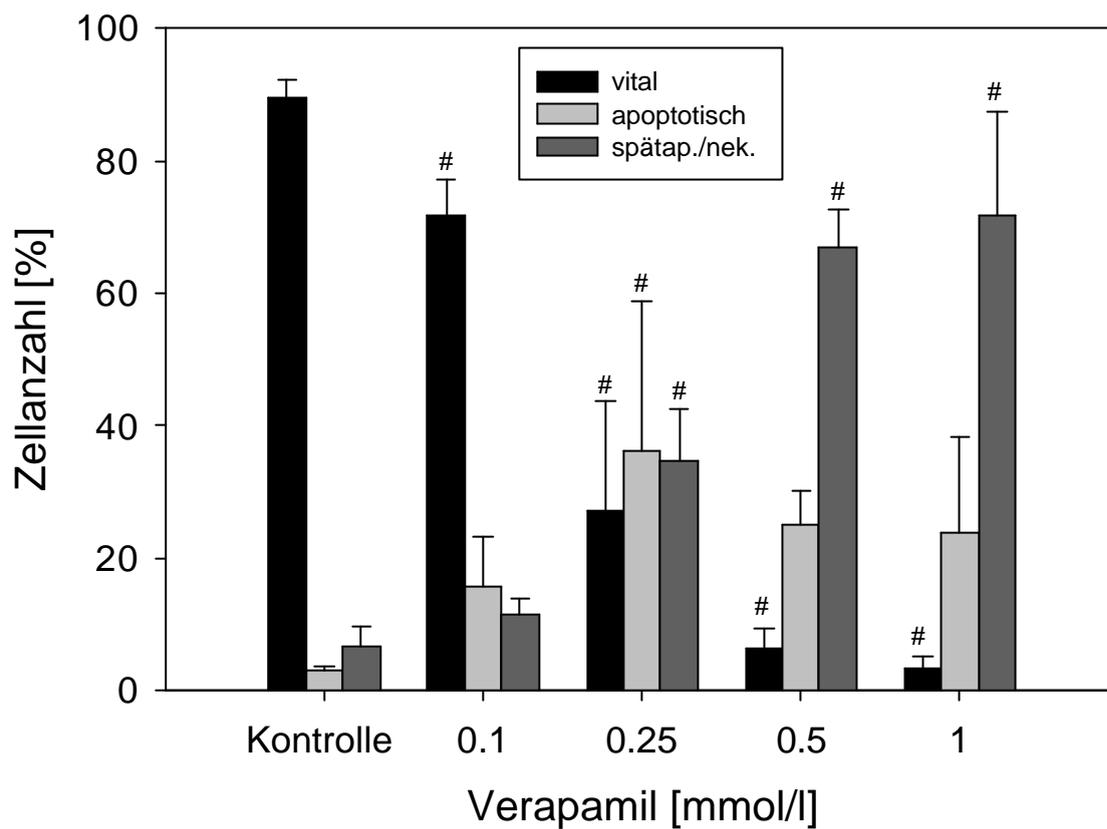


Abb. 16: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **48 h Exposition mit Verapamil** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



4-Aminopyridin

Bereits 24 h nach Zugabe des K⁺-Kanalblockers 4-Aminopyridin ist für die Konzentrationen 2,5; 5 und 10 mmol/l eine signifikante Abnahme der vitalen Zellpopulation festzustellen (Abb. 17). Die Verringerung dieses Anteils steht im Zusammenhang mit der Erhöhung der spätapoptotisch / nekrotischen Zellanzahl für den gleichen Konzentrationsbereich. Die Zunahme des rein apoptotischen Anteils fiel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur gering aus.

Erst nach 48 h Inkubationzeit ist für die höchste Konzentration von 10 mmol/l ein signifikanter Einfluss auf die Apoptoseauslösung zu verzeichnen. Für die gleiche Konzentration konnte dabei ein zunehmender Verlust der Membranintegrität nachgewiesen werden, der sich in einem erhöhten Anteil spätapoptotisch / nekrotischer Zellen ausdrückt (Abb. 18).

Abb. 17: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **24 h Exposition mit 4-Aminopyridin** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, p < 0,05)

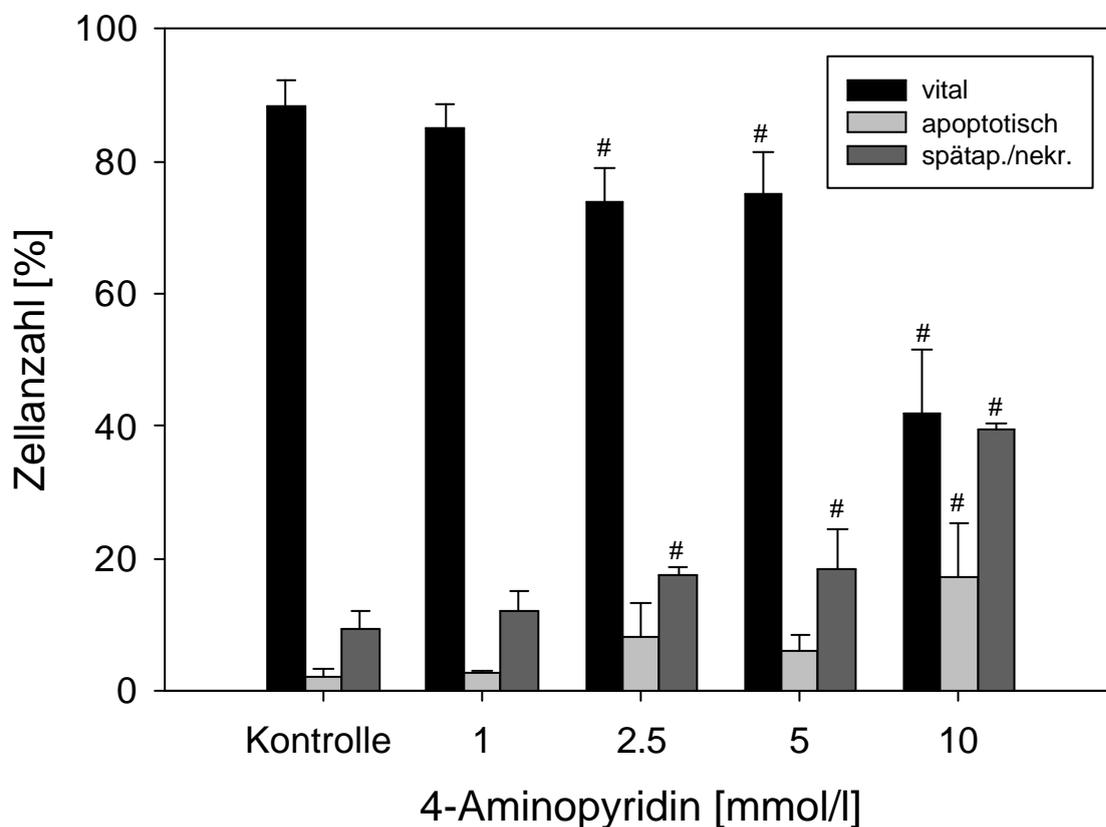
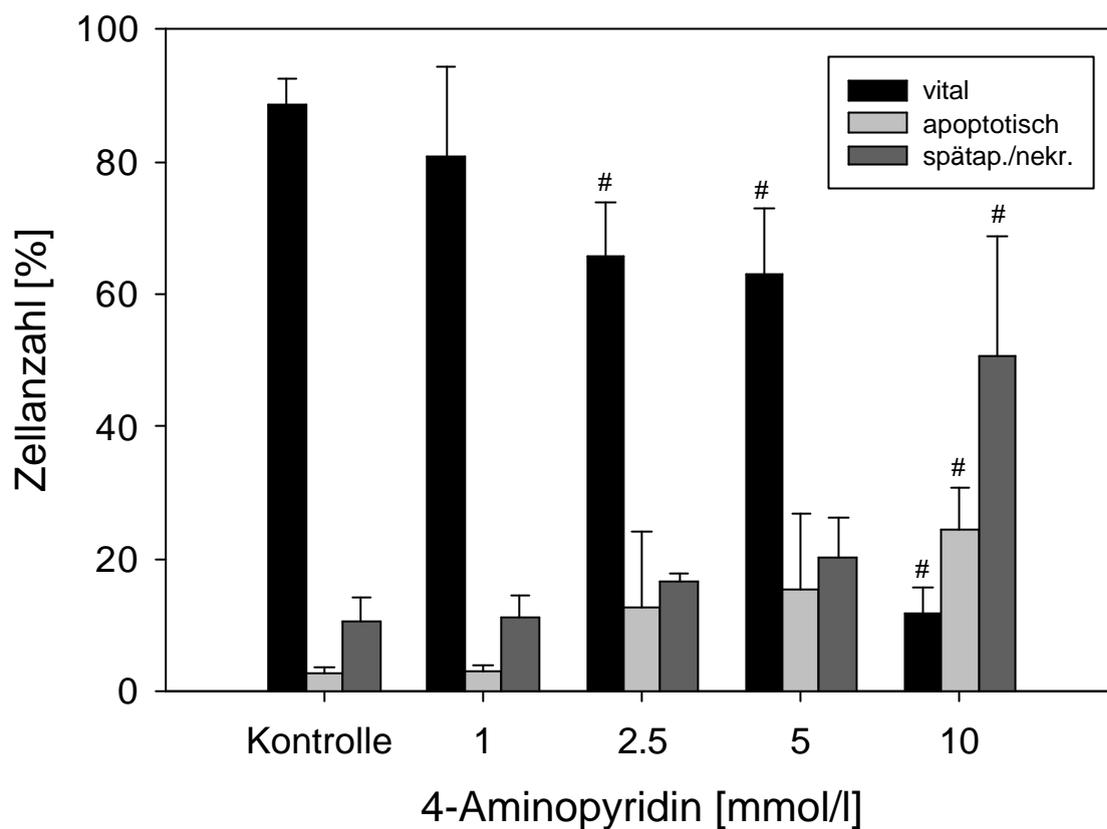


Abb. 18: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **48 h Exposition mit 4-Aminopyridin** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



Lidocain

Chondrozyten, welche 24 h unter dem Einfluss von Lidocain kultiviert wurden, zeigten in keiner der verwendeten Lidocainkonzentrationen (0,5; 1; 2,5; 5 mM) eine Erhöhung der Annexin-V-FITC-positiven Zellen (Abb. 19). Erst nach 48-stündiger Inkubationszeit ließ sich bei Lidocainkonzentrationen von 2,5 mmol/l und 5 mmol/l eine Zunahme der Annexin-V-FITC-positiven Zellen nachweisen. Diese apoptotischen Ereignisse standen in Verbindung mit einer geringfügigen Erhöhung des spätapoptotisch / nekrotischen Anteils und einer Verringerung der vitalen Zellpopulation (Abb. 20).

Abb. 19: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **24 h Exposition mit Lidocain** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)

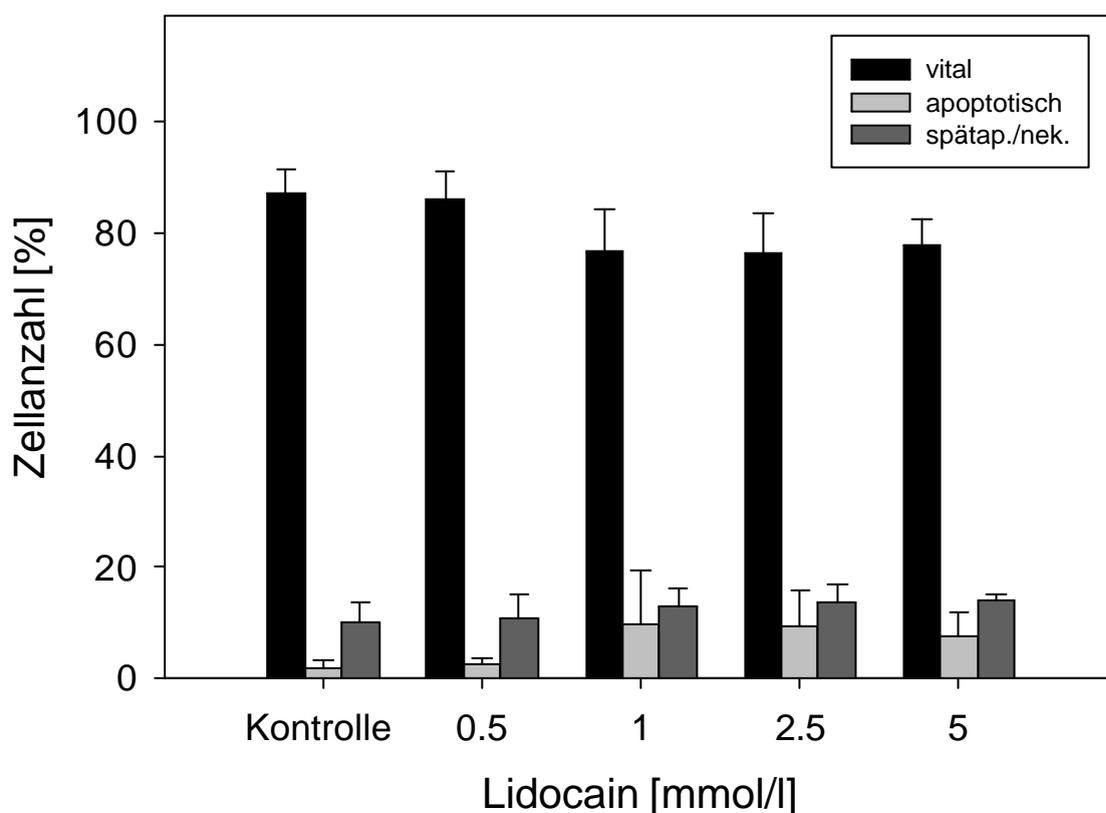
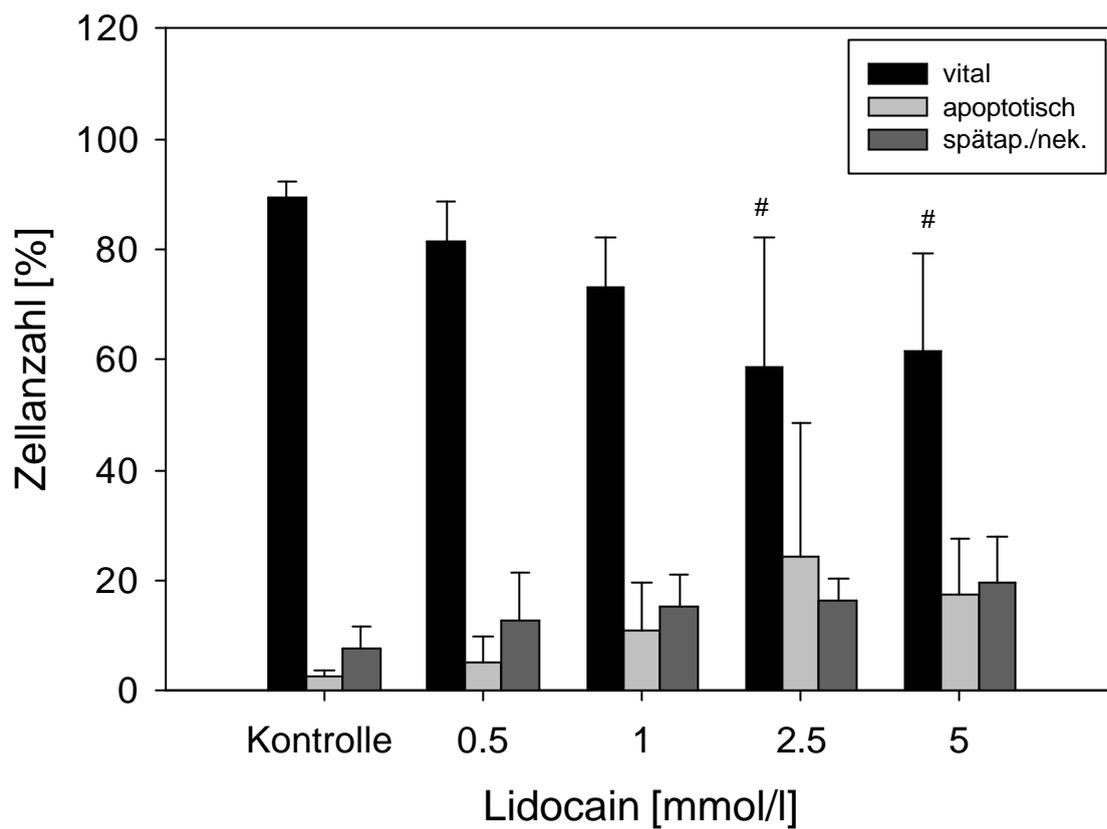


Abb. 20: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **48 h Exposition mit Lidocain** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



SITS

Unter dem Einfluss des Cl⁻- und Anionenkanalblockers SITS konnten weder nach 24 noch nach 48 h für den Konzentrationsbereich 0,5-5 mmol/l apoptotische Effekte anhand der Quantifizierung des Annexin-V-FITC-Signals nachgewiesen werden. Die signifikante Verringerung der vitalen Zellen nach 24 h bei einer SITS-Konzentration von 2,5 bzw. 5 mmol/l ist allein auf die Zunahme der spätapoptotisch / nekrotischen Zellanzahl zurückzuführen (Abb. 21). Nach 48 h sind nur geringfügige Veränderungen des Funktionszustandes der Zellpopulation gegenüber 24 h zu beobachten (Abb. 22).

Abb. 21: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **24 h Exposition mit SITS** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)

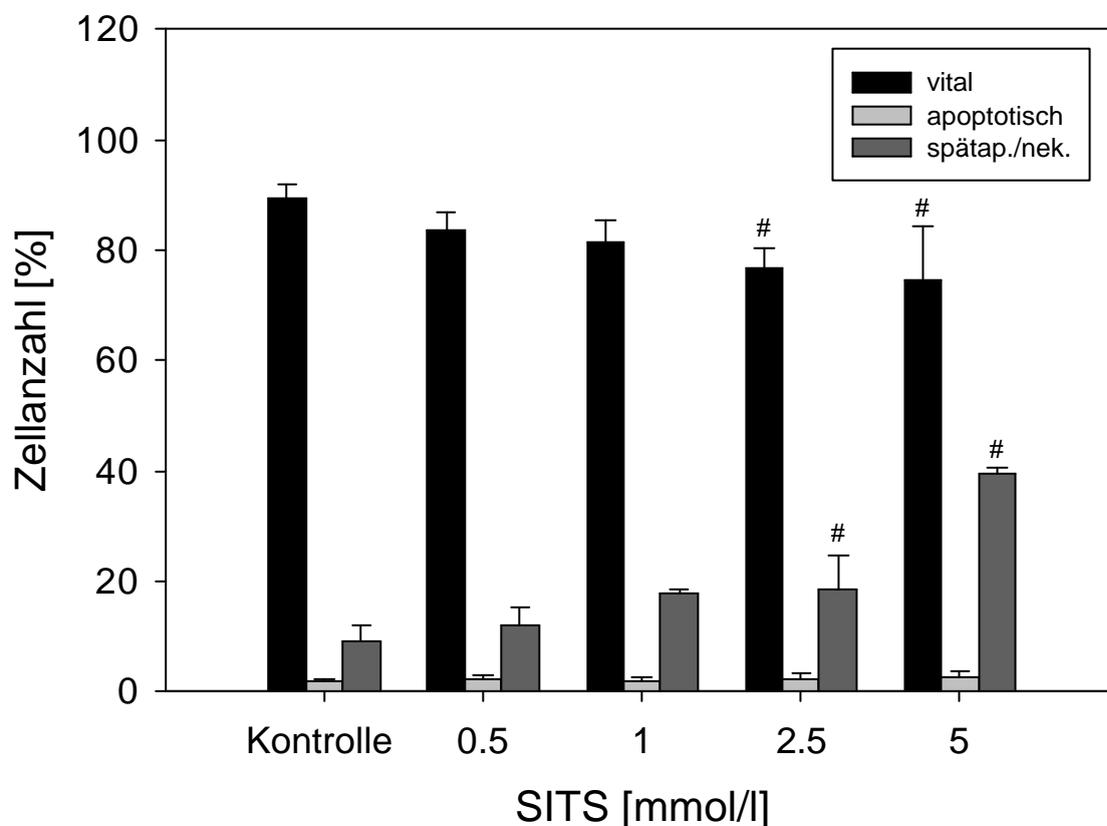
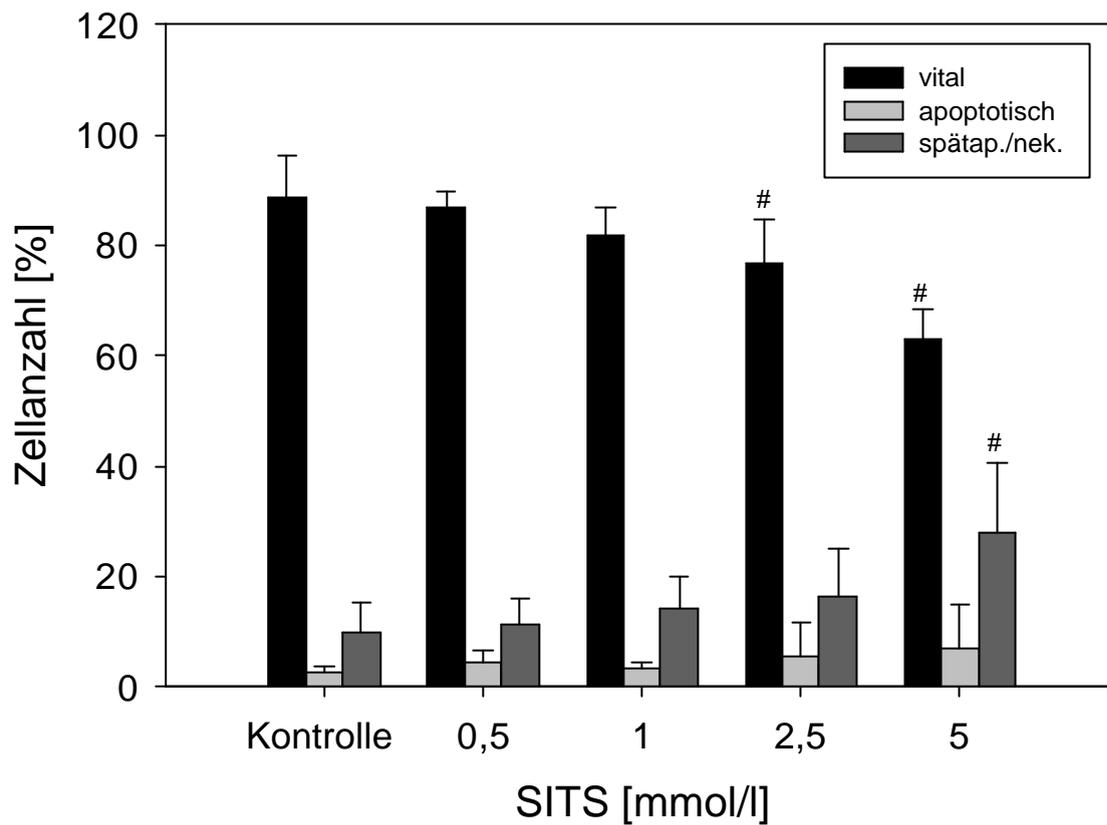


Abb. 22: Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid bei humanen Chondrozyten nach **48 h Exposition mit SITS** (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



3.6.2 Nachweis des Mitochondrienmembranproteins Apo2.7

Zur Detektion von Apoptoseprozessen stellt die Bestimmung des Mitochondrienmembranproteins Apo2.7 einen weiteren Parameter dar. Der Nachweis von Apo2.7 dient wie auch die Bestimmung der Translokation des Phosphatidylserins dem Nachweis frühapoptotischer Ereignisse. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Apo2.7-Expression sind Einzelwerte (Tab. 10). Da sie keine zusätzlichen Aussagen zum apoptotischen Verlauf erbrachten, wurde auf Grund der begrenzt verfügbaren Zellanzahl auf eine weitere Durchführung verzichtet (Siehe Kapitel 4.2.3).

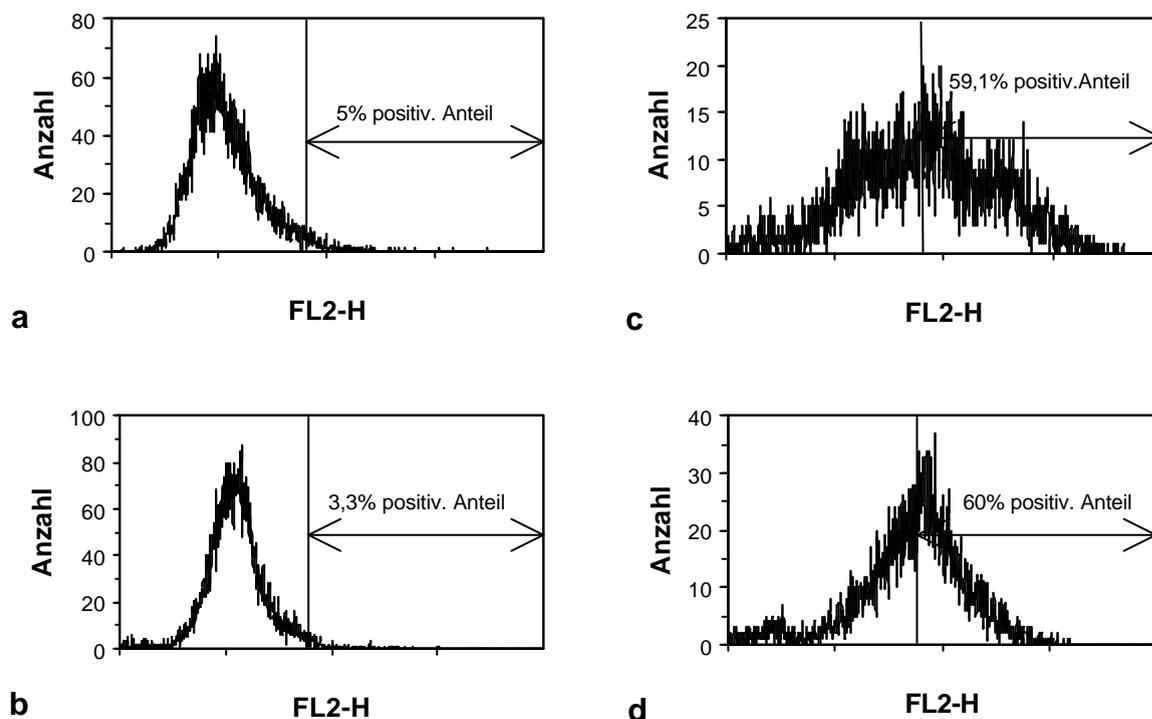
Tab. 10: Darstellung der Meßergebnisse für die flowzytometrische Bestimmung der Apo2.7-Expression in humanen Chondrozyten nach der Behandlung mit Ionenkanalblockern (N=1)

Blocker	Konzentration [mM]	24 h Behandlung pos. Anteil in %	48 h Behandlung pos. Anteil in %
Verapamil	Kontrolle	5	5
	0,1	4,96	3,27
	0,25	4,18	9,28
	0,5	13,04	59,1
	1	37,91	60,0
4-Aminopyridin	Kontrolle	5	5
	1	4,52	9,0
	2,5	5,37	6,89
	5	6,68	7,24
	10	24,51	38,52
Lidocain	Kontrolle	5	5
	0,5	5,19	6,13
	1	5,55	7,58
	2,5	6,55	7,3
	5	7,53	7,26
SITS	Kontrolle	5	5
	0,5	7,03	5,92
	1	8,86	6,56
	2,5	22,86	11,4
	5	33,27	14,85

Verapamil

Nach 24 h Inkubationsdauer zeigte sich bei Chondrozyten, welche mit 1 mmol/l Verapamil behandelt wurden, eine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Eine deutliche Erhöhung der apoptotischen Zellanzahl ließ sich nach 48-stündiger Inkubation mit 0,5 mmol/l und 1 mmol/l Verapamil nachweisen. Bei 1 mmol/l Verapamil wiesen 60% der untersuchten Zellen apoptotische Merkmale auf (Abb. 23).

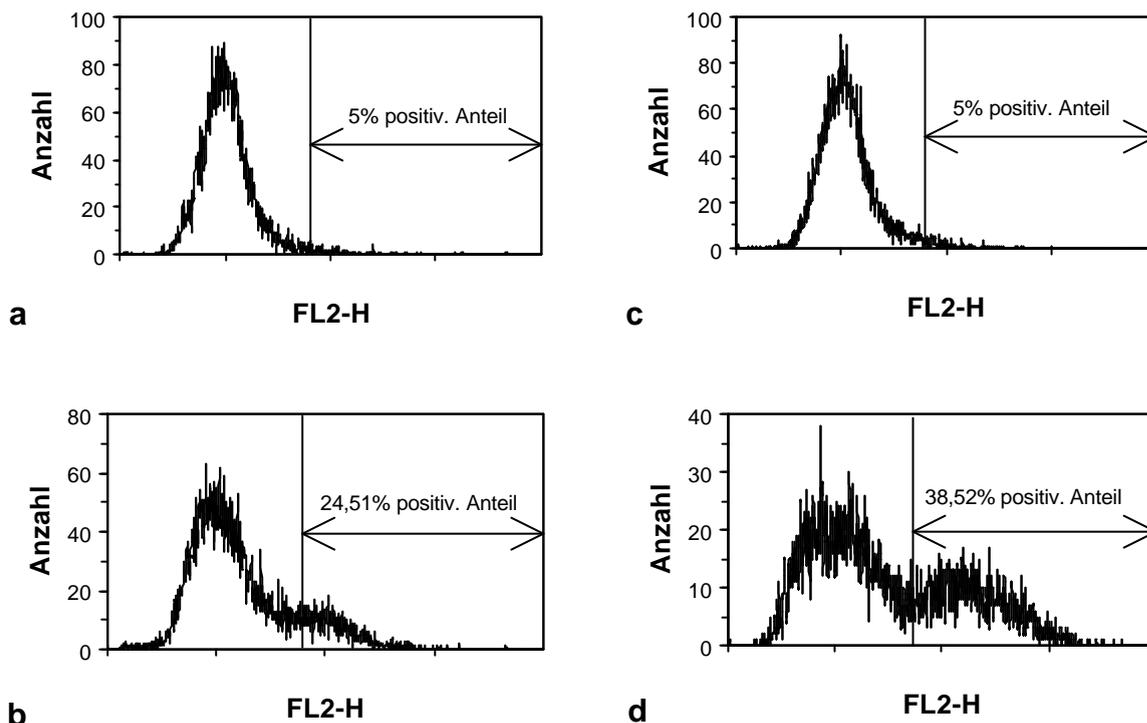
Abb. 23: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apo2.7-Expression in humanen Chondrozyten 48 h nach Verapamilzugabe: a) unbehandelte Kontrolle b) 0,1 mmol/l c) 0,5 mmol/l d) 1 mmol/l



4-AP

Unter Zugabe von 4-AP war nach 24 h für die Konzentration von 10 mmol/l eine Zunahme der apoptotischen Zellen zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität zeigte einen deutlichen Apo2.7-positiven Anteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 48-stündiger Inkubationszeit nimmt der Apo2.7-positive Anteil von 25% auf 39% nochmals zu (Abb. 24).

Abb. 24: Flowzytometrische Bestimmung der Apo2.7-Expression in humanen Chondrozyten a) 24h unbehandelte Kontrolle b) 24 h nach Exposition mit 10 mM 4-Aminopyridin c) 48 h unbehandelte Kontrolle d) 48 h nach Exposition mit 10 mM 4-Aminopyridin



Lidocain

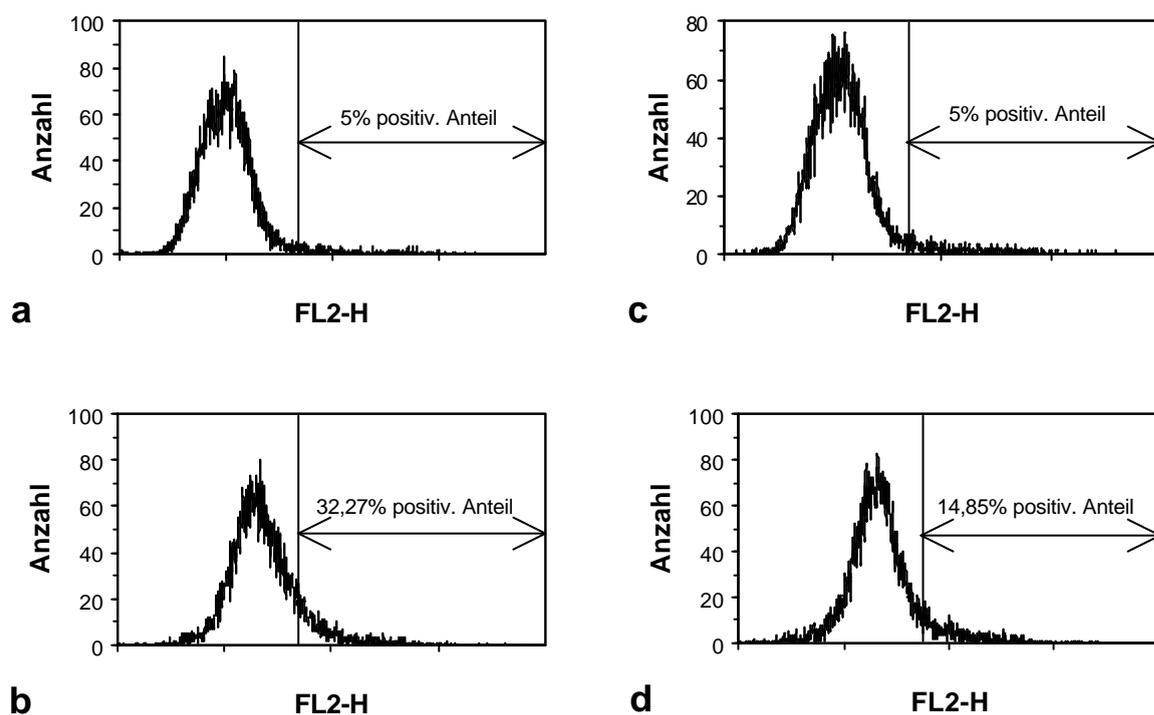
Die unter dem Einfluss von Lidocain kultivierten Chondrozyten zeigten bei keiner der verwendeten Konzentrationen unabhängig von der Inkubationszeit eine Erhöhung Apo2.7-positiver Zellen.

SITS

Unter Einfluss von SITS war nach 24 h bereits für 1 mmol/l ein erhöhter Anteil Apo2.7-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die resultierende Erhöhung der Fluoreszenzintensität setzte sich für SITS-Konzentrationen von 2,5 bzw 5 mmol/l fort und ergab für diese Konzentrationen eine deutliche Steigerung gegenüber der unbehandelten Probe. Die höchste Steigerungsrate von 33% wurde bei einer SITS-Konzentration von 5 mmol/l gemessen. Nach 48 h Inkubation war keine signifikante Steigerung der Apo2.7-

positiven Zellanzahl und somit der apoptotischen Effekte gegenüber 24 h festzustellen (Abb. 25).

Abb. 25: Flowzytometrische Bestimmung der Apo2.7-Expression in humanen Chondrozyten a) 24 h unbehandelte Kontrolle b) 24 h nach Exposition mit 5 mM SITS c) 48 h unbehandelte Kontrolle d) 48 h nach Exposition mit 1 mmol/l SITS



3.6.3 Nachweis der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18

Die Bestimmung der Aktivierung der Caspase 3 stellt eine weitere Methode zur Charakterisierung der Apoptose dar und ermöglicht die Erfassung spätapoptotischer Ereignisse.

Verapamil

Bereits 24 h nach der Verapamil-Zugabe waren apoptotische Prozesse für die Konzentration 1 mmol/l detektierbar. Der Bereich 0,1-0,5 mmol/l zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Chondrozytenpopulation. Nach 48 h war neben der Zunahme der Caspase 3-positiven Zellen bei 1 mmol/l eine signifikante Erhöhung des apoptotischen Anteils bereits bei 0,5 mmol/l festzustellen (Abb. 27).

Abb. 26: Durchflusszytometrische Bestimmung der Caspase 3-Aktivierung in humanen Chondrozyten; a) 48 h unbehandelte Kontrolle b) 48 h nach Exposition mit 1 mM Verapamil

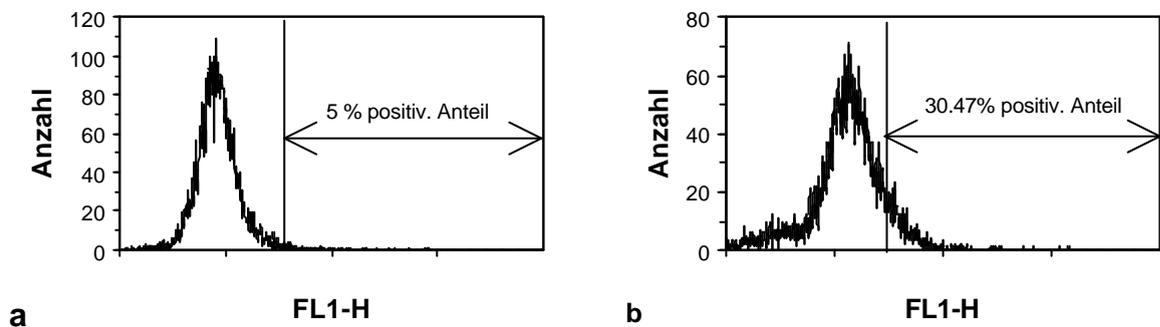
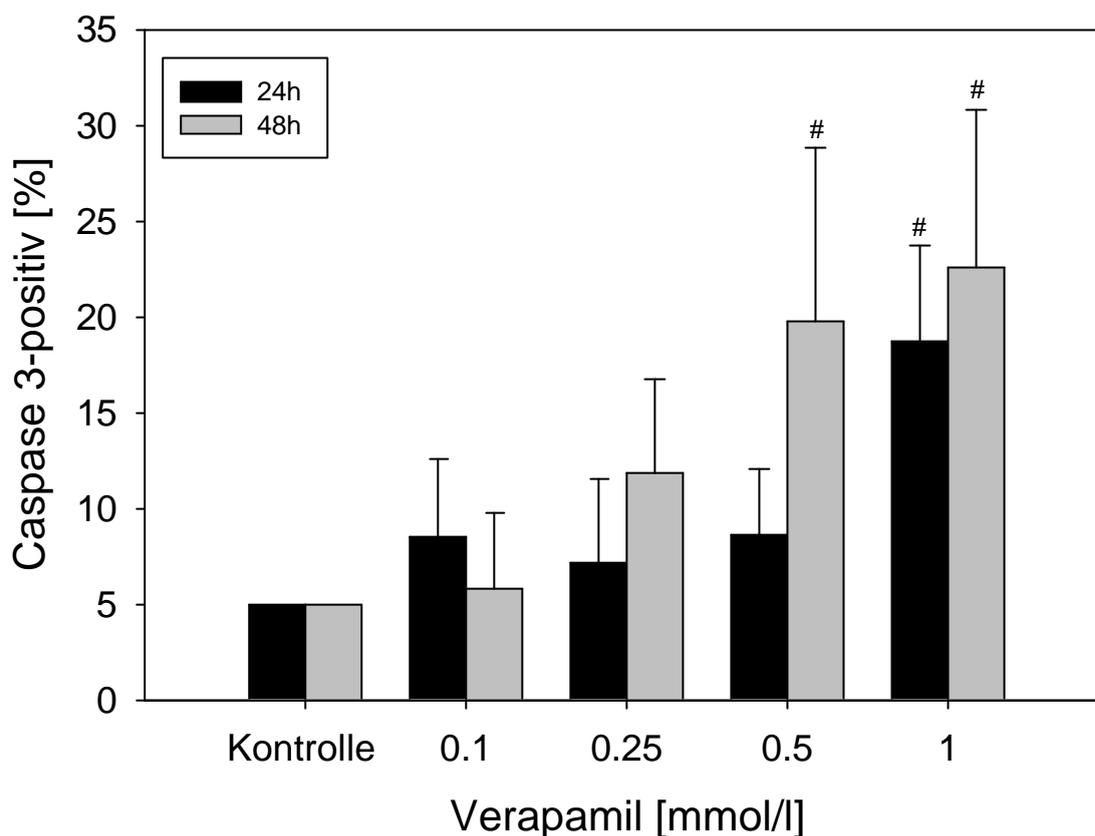


Abb. 27: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Messung des aktivierten Caspase 3-Anteils humaner Chondrozyten nach Zugabe von Verapamil (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



4-AP

Die Abb. 29 lässt erkennen, dass nach 24 h lediglich für die höchste 4Aminopyridin-Konzentration von 10 mmol/l eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden konnte. 48 h nach Zugabe zeigten für diese Konzentration bereits ca. 40% der Zellen mit dem anti-aktive-Caspase 3-Antikörper eine positive Reaktion und konnten somit als apoptotisch nachgewiesen werden. Abb. 28 zeigt beispielhaft den Anstieg des aktivierten Caspase 3-Anteils einer Chondrozyten-Population.

Abb. 28: Durchflusszytometrische Bestimmung der Caspase 3-Aktivierung in humanen Chondrozyten; a) unbehandelte Kontrolle b) 48 h nach Exposition mit 10 mM 4-Aminopyridin

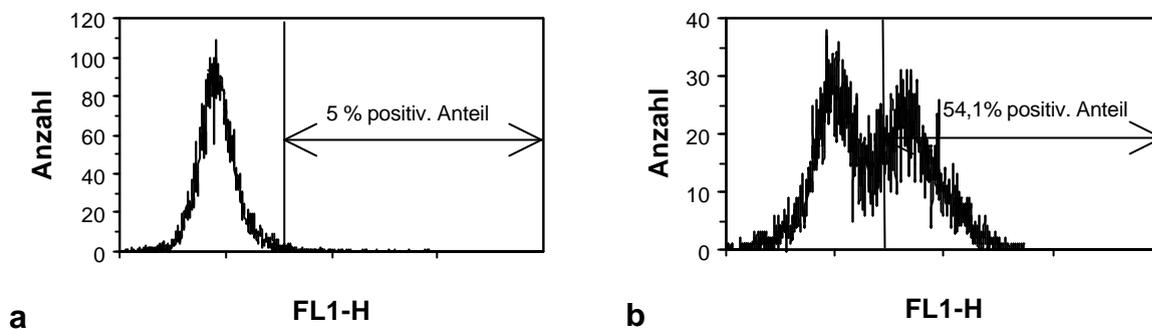
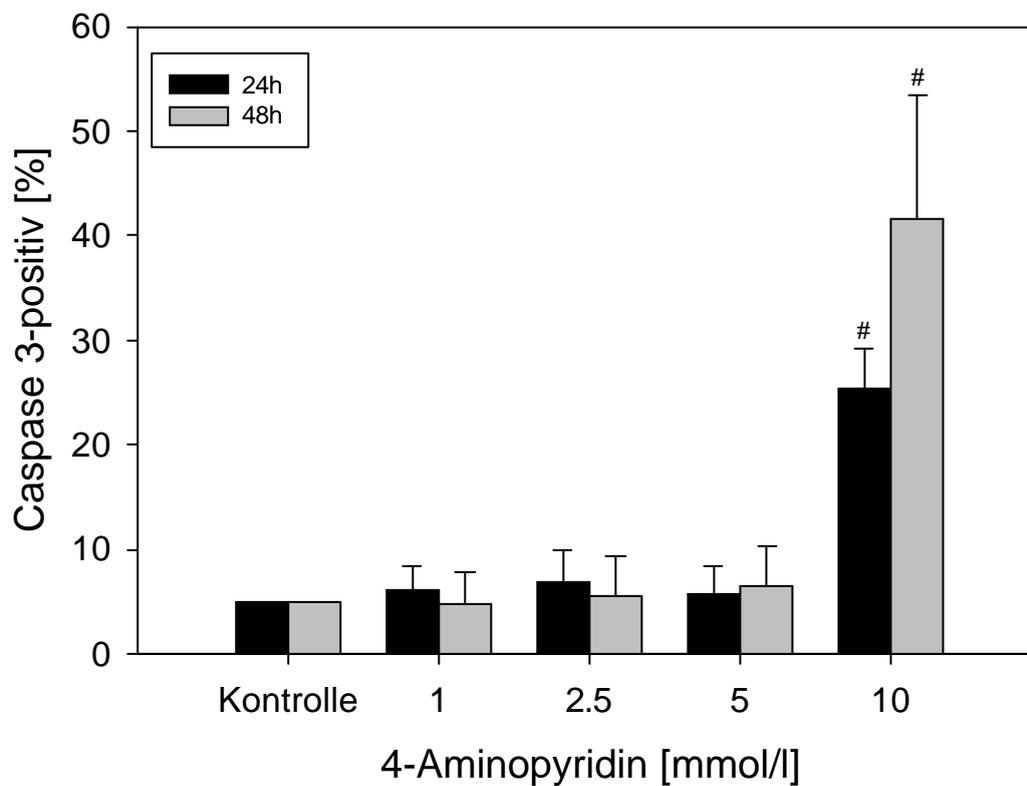


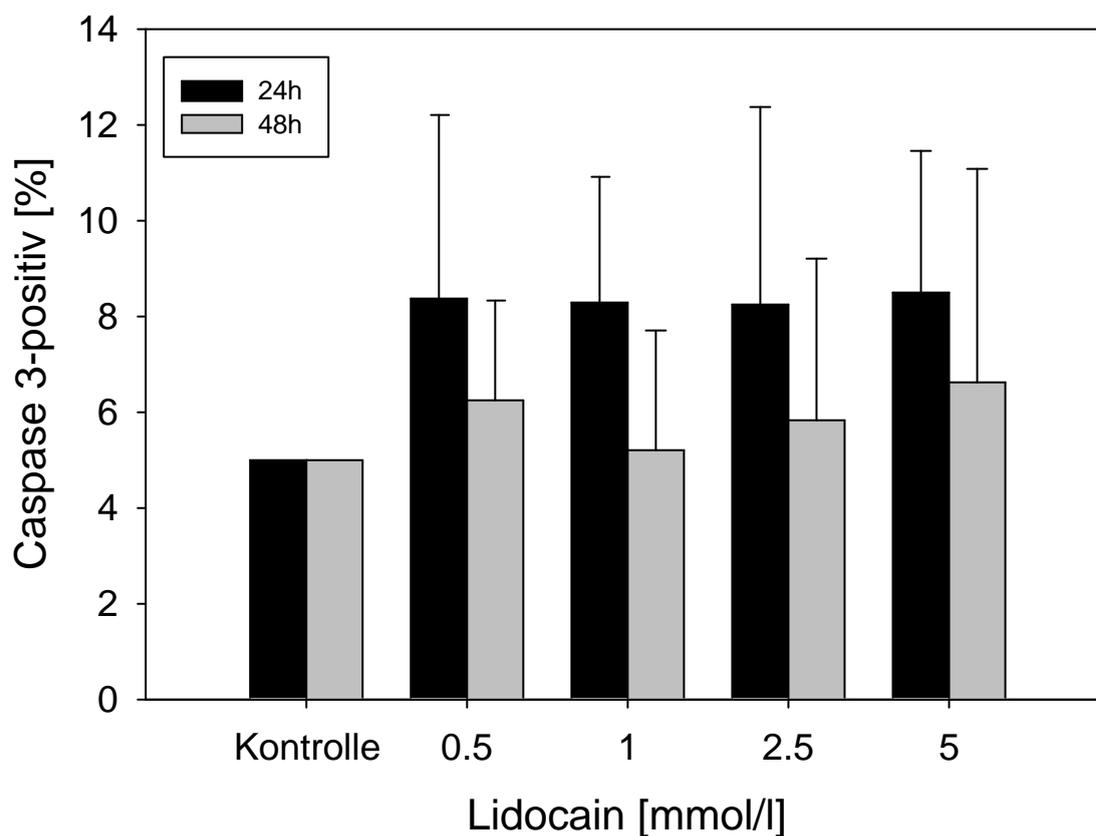
Abb. 29: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Messung des aktivierten Caspase 3-Anteils humaner Chondrozyten nach Zugabe von 4-Aminopyridin (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



Lidocain

Für keine der verwendeten Konzentrationen konnte nach 24 h ein Einfluss von Lidocain auf die Caspaseaktivierung nachgewiesen werden. Auch nach Verlängerung der Inkubationszeit zeigte sich keine signifikante Zunahme der aktivierten-Caspase 3-positiven Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 30).

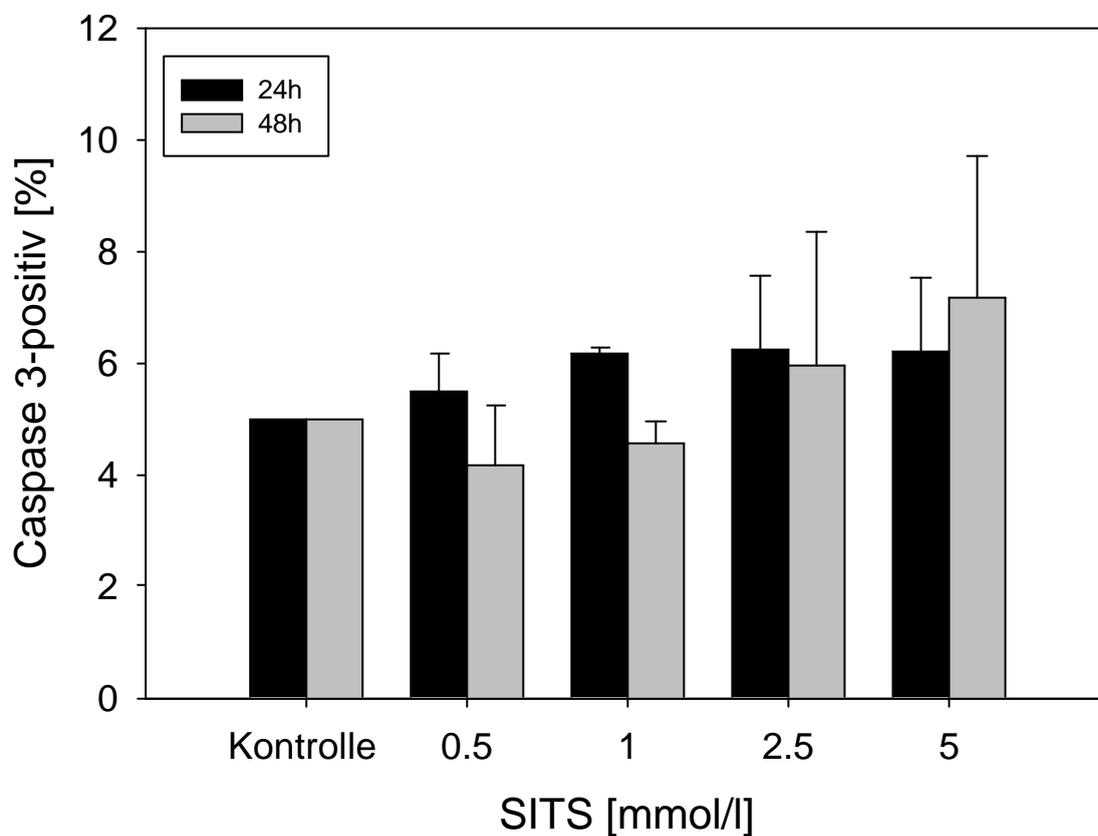
Abb. 30: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Messung des aktivierten Caspase 3-Anteils humaner Chondrozyten nach Zugabe von Lidocain (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



SITS

Für keine der verwendeten Konzentrationen konnte nach 24 h ein Einfluss von SITS auf die Caspaseaktivierung nachgewiesen werden. Auch nach Verlängerung der Inkubationszeit zeigte sich keine signifikante Zunahme der aktivierten-Caspase 3-positiven Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 31).

Abb. 31: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Messung des aktivierten Caspase 3-Anteils humaner Chondrozyten nach Zugabe von SITS (n=3) (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



3.7 Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die CD44-Expression humaner Chondrozyten

Der CD44-Rezeptor stellt den wichtigsten Hyaluronsäurerezeptor dar. Um den Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Expression des CD44-Rezeptors zu untersuchen, war der quantitative Nachweis des CD44-Rezeptors an humanen Chondrozyten notwendig.

Der Nachweis des CD44-Membranproteins bei Chondrozyten erfolgte durch den Vergleich mit der Isotypkontrolle. Dabei wurde die Anzahl der merkmalttragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten CD44-Antikörpers bestimmt (Abb. 32).

Die statistische Auswertung der Einzelexperimente zeigt den Unterschied zwischen der Isotypkontrolle und den mit CD44-Antikörper behandelten Proben jeweils mit und ohne Zusatz eines Ionenkanalblockers. Dabei wurden die mit CD44-Antikörper behandelten Proben ohne Zusatz eines Blockers (Kontrollgruppe) als 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diese Kontrollgruppe bezogen und statistisch ausgewertet [166].

Die Abb. 33 zeigt die Ergebnisse des Einflusses der verschiedenen Ionenkanalmodulatoren auf die CD44-Expression humaner Chondrozyten nach 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubationsdauer. Unter dem Einfluss von Lidocain und 4-AP konnten Veränderungen der CD44-Expression humaner Chondrozyten nachgewiesen werden. Hier kam es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität von 43% bzw. 30% bei Lidocain nach 24 h bzw. 48 h. Für 4-AP waren Fluoreszenzintensitäten von 43% bzw. 36% nach 24 h bzw. 48 h nachweisbar (Abb. 33). Diese Steigerung der CD44-Expression war nach längerer Einwirkungsdauer der genannten Ionenkanalmodulatoren nicht mehr nachweisbar (Abb. 34).

Nach verlängerter Inkubationszeit bei Zugabe der Ionenkanalblocker am 2. Kulturtag und Bestimmung der CD44-Expression nach 6, 12 bzw. 18 Kulturtagen ließen sich Veränderungen der Fluoreszenzintensität lediglich bei Verapamil und SITS nachweisen. Unter dem Einfluss von Verapamil zeigte sich nach 6 und 12 Kulturtagen eine Verminderung der Fluoreszenzintensität um 37% bzw. 45% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei dem Chlorid- und Anionenkanalblocker SITS war eine Abnahme der Fluoreszenzintensität als Maß für die CD44-Rezeptorexpression an allen Messtagen nachweisbar. Es zeigte sich nach 6 Kulturtagen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität auf 68% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 12 bzw. 18 Kulturtagen betragen die mittleren Fluoreszenzwerte 52% bzw. 71% im Vergleich zur Kontrolle. (Abb. 34).

Abb. 32: Durchflusszytometrischer Nachweis des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 bei humanen Chondrozyten im Vergleich zur Isotypkontrolle (IK)

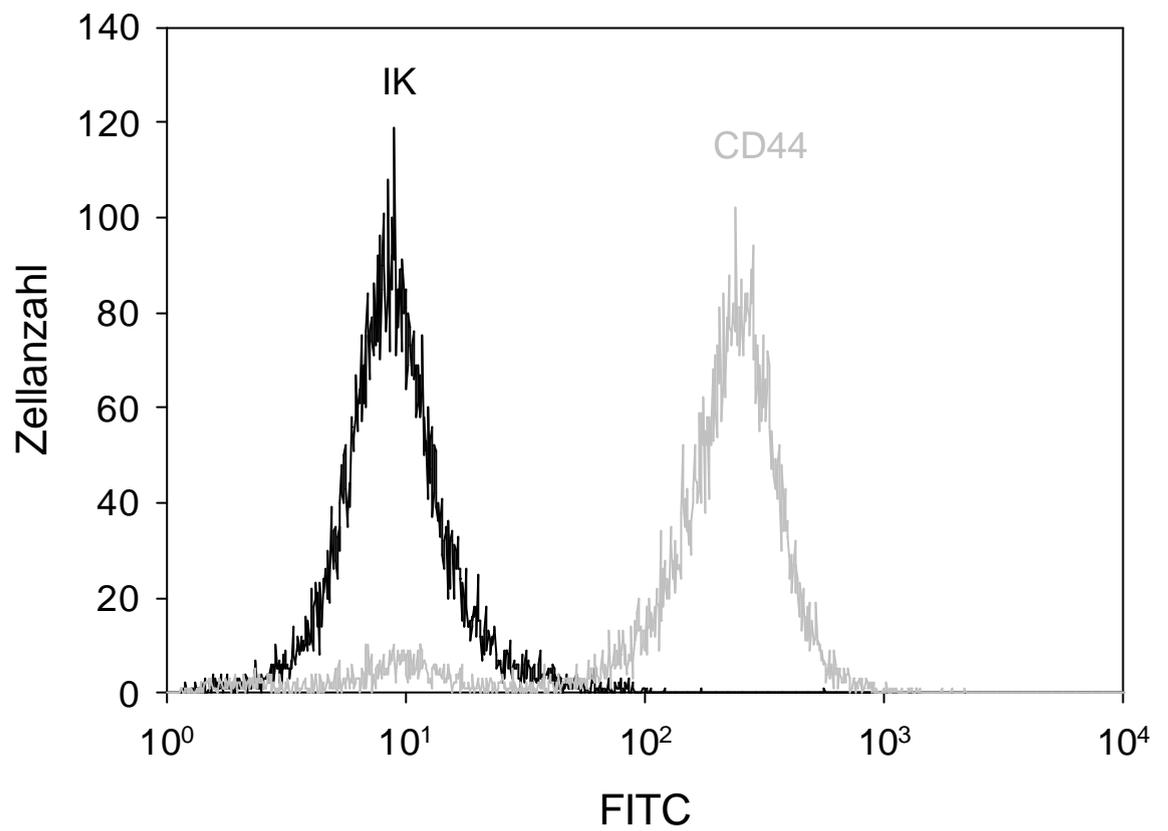
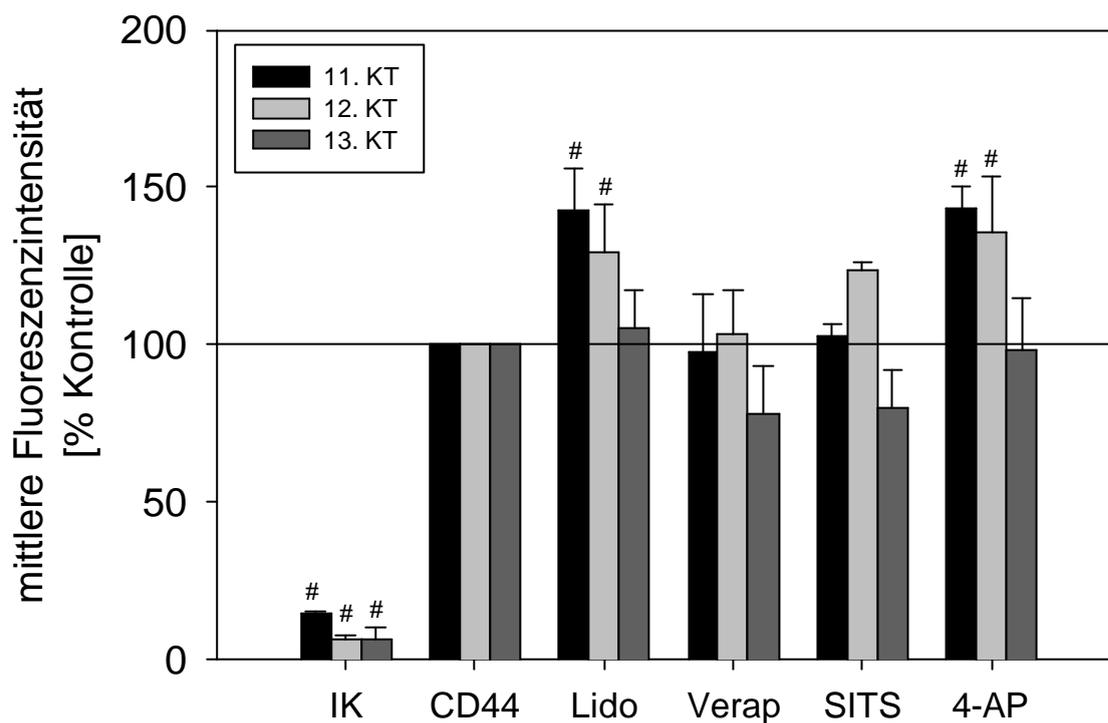


Abb. 33: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD44-Rezeptorexpression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss eines Ionenkanalmodulators in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe des Ionenkanalmodulators am 10. Kulturtag (KT). Lidocain 0,1 mmol; Verapamil 0,08 mmol; SITS 0,25 mmol; 4-AP 1,0 mmol. (N=5)
 (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CD44), $p < 0,05$)



IK = Isotypkontrolle

CD44 = Positivkontrolle

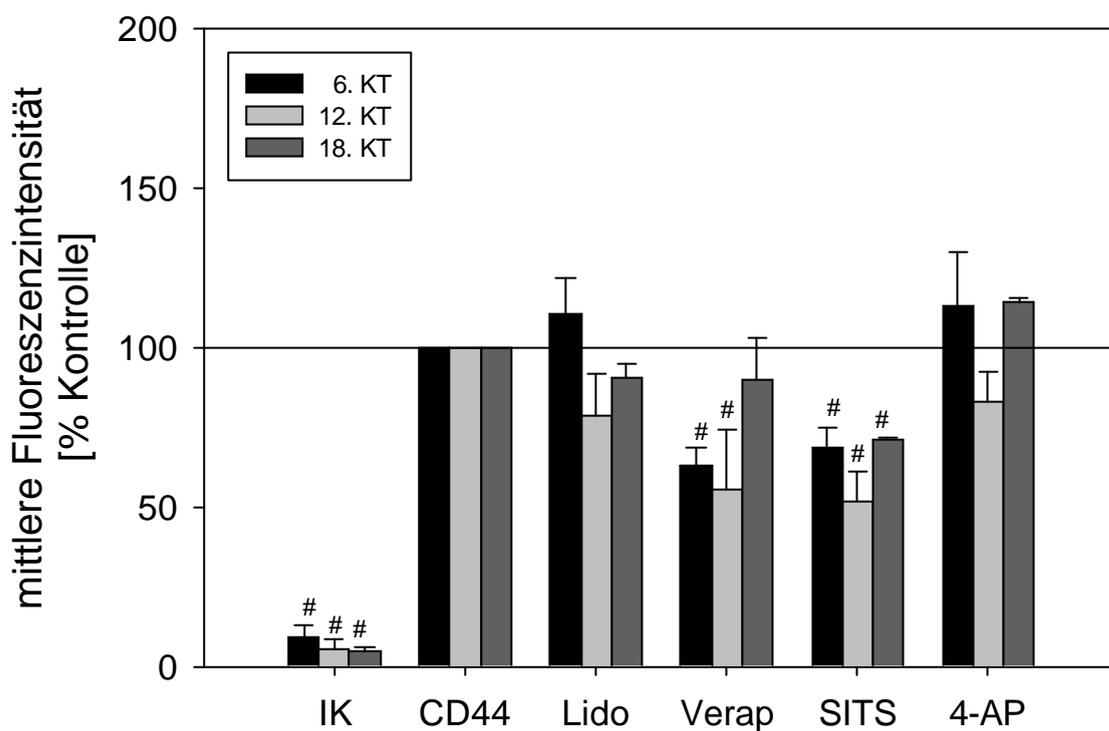
Lido = Lidocain

Verap = Verapamil

SITS = 4-Acetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Disulfonsäure Stilben

4-AP = 4-Aminopyridin

Abb. 34: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD44-Rezeptorexpression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss eines Ionenkanalmodulators in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe des Ionenkanalmodulators am 2. Kulturtag (KT). Lidocain 0,1 mmol; Verapamil 0,08 mmol; SITS 0,25 mmol; 4-AP 1,0 mmol. (N=5)
 (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



IK = Isotypkontrolle

CD44 = Positivkontrolle

Lido = Lidocain

Verap = Verapamil

SITS = 4-Acetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Disulfonsäure Stilben

4-AP = 4-Aminopyridin

3.8 Der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Synthese von Kollagen Typ I und Typ II

Kollagen Typ II stellt einen wesentlichen Baustein der hyalinen Knorpelmatrix dar und wird von den Chondrozyten selbst synthetisiert. Werden Chondrozyten aus dem Knorpelverbund herausgelöst, ist während der in vitro Kultur eine Dedifferenzierung nachzuweisen. Hierbei ändern sie neben ihrem Phänotyp auch zellspezifische Leistungen, insbesondere Syntheseleistungen. Ein klassisches Merkmal der Dedifferenzierung von Chondrozyten ist die Einstellung der Synthese von Kollagen Typ II und stattdessen eine sonst nicht zu beobachtende Synthese von Kollagen Typ I. Bei längerer in vitro Kultur redifferenzieren Chondrozyten auch wieder und nehmen dann ihre primären Syntheseleistungen wieder auf [45].

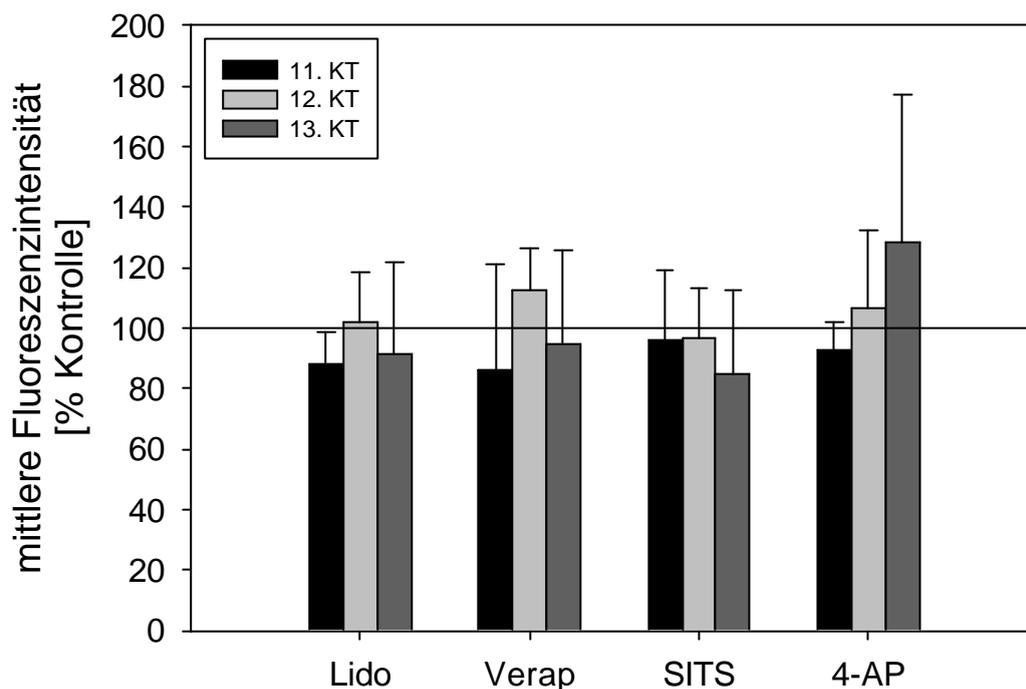
Um den Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Steuerung dieser spezifischen Stoffwechselleistungen der Chondrozyten zu untersuchen, wurde der quantitative Nachweis des zellulären Kollagen Typ I und Typ II humaner Chondrozyten durchgeführt.

Der Nachweis dieser beiden Kollagen-Typen bei Chondrozyten erfolgte durchflusszytometrisch durch den Vergleich mit der Isotypkontrolle. Dabei wurde die Anzahl der merkmalttragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten Kollagen Typ I bzw. Typ II-Antikörpers bestimmt.

Die statistische Auswertung der Einzelexperimente zeigt den Unterschied zwischen den mit Kollagen Typ I oder Typ II behandelten Proben jeweils mit und ohne Zusatz eines Ionenkanalblockers. Dabei wurden die mit Antikörper behandelten Proben ohne Zusatz eines Blockers (Kontrollgruppe) als 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden prozentual auf diese Kontrollgruppe bezogen und statistisch ausgewertet.

In Abb. 35 sind die Ergebnisse des Einflusses der verschiedenen Ionenkanalmodulatoren auf die Kollagen Typ I - Expression humaner Chondrozyten zusammengefasst. Die Zugabe des jeweiligen Ionenkanalmodulators erfolgte am 10. Kulturtag. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Chondrozyten-eigenen Kollagen Typ I-Synthese erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24h, 48h bzw. 72h. Aufgrund der zum Teil großen Standardabweichungen waren hier keine Unterschiede der Kollagen Typ I – Syntheseleistung durch den Einsatz der genannten spezifischen Ionenkanalblocker statistisch zu sichern.

Abb. 35: Durchflusszytometrische Bestimmung der Kollagen Typ I - Expression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss eines Ionenkanalmodulators in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe des Ionenkanalmodulators am 10. Kulturtag. Lidocain 0,1 mmol; Verapamil 0,08 mmol; SITS 0,25 mmol; 4-AP 1,0 mmol. (N=5)
 (# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



Lido = Lidocain

Verap = Verapamil

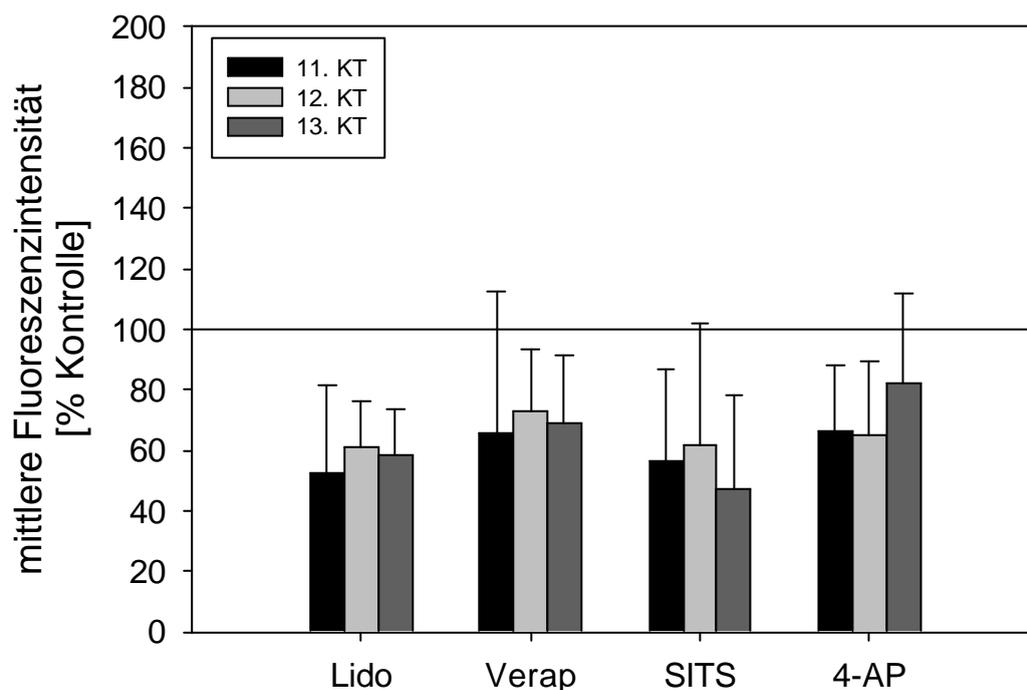
SITS = 4- Acetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Disulfonsäure Stilben

4-AP = 4-Aminopyridin

In Abb. 36 sind die Ergebnisse des Einflusses der verschiedenen Ionenkanalmodulatoren auf die Kollagen Typ II - Expression humaner Chondrozyten dargestellt. Die Zugabe des jeweiligen Ionenkanalmodulators und die durchflusszytometrische Messung der Kollagen Typ II-Synthese erfolgte in Analogie des Verfahren zur Kollagen Typ I – Bestimmung. Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen Ionenkanalblockern die Expression von Kollagen-Typ II gehemmt wird. Die Hemmung der Kollagen Typ II-Synthese war bei Na^+ -Kanalblockade durch Lidocain und bei Hemmung der Cl^- -Kanäle mittels SITS am ausgeprägtesten. So konnte unter dem Einfluss von Lidocain nach 24-stündiger Inkubation ein maximaler

Hemmeffekt gemessen werde. Hier sank die Kollagen Typ II – Expression auf 53% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die deutlichste Abnahme der Syntheseleistung durch SITS war erst nach 72-stündiger Inkubation feststellbar. Hier war eine Abnahme der Kollagen Typ II – Syntheserate auf 48% messbar.

Abb. 36: Durchflusszytometrische Bestimmung der Kollagen Typ II - Expression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss eines Ionenkanalmodulators in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe des Ionenkanalmodulators am 10. Kulturtag. Lidocain 0,1 mmol; Verapamil 0,08 mmol; SITS 0,25 mmol; 4-AP 1,0 mmol. (N=5)
(# signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$)



Lido = Lidocain

Verap = Verapamil

SITS = 4- Acetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Disulfonsäure Stilben

4-AP = 4-Aminopyridin

4 Diskussion

4.1 Pathomechanismus der Arthrose

Die Arthrose ist ein Krankheitsbild, welches unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten extrem hohe Kosten für die betroffenen Patienten und die Gesellschaft verursacht. Am häufigsten sind Knie- und Hüftgelenke betroffen. Nach einer US-amerikanischen Studie leiden schätzungsweise 13% aller Frauen im Alter von 55 bis 64 Jahren sowie ca. 17% aller 65- bis 74-jährigen unter Arthrose-typischen Symptomen wie Schmerzen und funktionellen Einschränkungen des Kniegelenkes [134]. Aus der Rotterdam-Studie geht hervor, dass von 1040 Probanden im Alter von 55 bis 65 Jahren lediglich 135 keine radiologischen Zeichen einer Arthrose der Knie-, Hüft-, Wirbel- oder Handgelenke aufwiesen [84]. Mehrere klinische Studien belegen, dass die Inzidenz für die Arthrose steigt. So sind in den Niederlanden in der Bevölkerungsgruppe der 46- bis 66-jährigen bei Frauen jährlich 2% und bei Männern 0,8% Neuerkrankungen zu beobachten.

Für die Entstehung und Progredienz einer degenerativen Gelenkerkrankung ist eine Vielzahl von Faktoren von Bedeutung. An erster Stelle steht hier das Körpergewicht. Mit steigendem Körpergewicht nimmt die Belastung der Gelenke, insbesondere der Gelenke der unteren Extremität, zu. Weiterhin stellen das Patientenalter und die damit verbundenen strukturfunktionellen Veränderungen einen Risikofaktor für die Entstehung der Arthrose dar. Chondrozyten des alternden Knorpelgewebes zeigen eine beeinträchtigte Zellfunktion mit sich ändernden Reaktionen auf die Präsenz von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Zusätzlich werden im Alter gelenkprotektive nervale und mechanische Strukturen wie z. B. die Propriozeption, die Varus-Valgus-Laxizität, die Muskelspannung und das Körpergewicht beeinträchtigt [134]. Geschlechtsspezifische Merkmale wie z.B. Unterschiede im Hormonhaushalt, im Knorpelmetabolismus und bei den Folgen von Verletzungen mit Gelenkbeteiligung sind ebenfalls für die Arthroseentwicklung von Bedeutung. So zeigen im Verhältnis von 3:2 mehr Frauen als Männer eine Gon- oder Coxarthrose in der Bevölkerungsgruppe der über 60-jährigen. Berufliche und Freizeitaktivitäten werden ebenfalls für die Entstehung der Arthrose mit verantwortlich gemacht. Das ständige Tragen schwerer Lasten, eine falsche Lastenverteilung und Verletzungen können die Arthroseentstehung begünstigen. Müssen dauerhaft Lasten von 25 kg oder mehr bewältigt werden, ist das Risiko für die Entstehung einer Gonarthrose in Abhängigkeit vom Body Mass Index (BMI) bis um das 5fache erhöht. Bei mittelschwerer körperlicher Arbeit steigt das Arthroserisiko für die Hüftgelenke

auf das 2,4-fache. Dagegen haben Freizeit-Jogger kein erhöhtes Arthroserisiko, wohl aber aktive und ehemalige Leistungssportler [134].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit steigender funktioneller Gelenkbelastung strukturelle Veränderungen insbesondere des Gelenkknorpels zunehmen.

Neben Knorpelveränderungen sind aber auch weitere Strukturveränderungen auf die durch die Arthrose hervorgerufene Pathologie der Gelenkfunktion nachzuweisen. So konnte beispielsweise in der Rotterdam-Studie [20] nachgewiesen werden, dass Patienten, welche an Arthrosen des Hüft- oder Kniegelenkes leiden, neben Veränderungen des Gelenkknorpels auch eine höhere Knochendichte aufwiesen. Die Arthrose ist somit eine Erkrankung, die initial an der Oberfläche des Gelenkknorpels beginnt, aber in ihrem Verlauf bei allen Gelenkstrukturen pathologische strukturelle Veränderungen hervorruft. Diese führen zur progredienten Beeinträchtigung der Gelenkfunktion.

Das Gelenk wird durch eine ganze Reihe weiterer Faktoren wie z. B. hormonelle, genetische, angeborene oder erworbene Strukturstörungen, aber auch durch Ernährungsgewohnheiten und Nikotinabusus in seiner Struktur und Funktion beeinflusst.

Neben den oben beschriebenen mechanischen Faktoren sind in jüngster Vergangenheit mehr und mehr feinstrukturelle Kenntnisse über biochemische Abläufe beschrieben worden, die an der Entstehung der Arthrose beteiligt sind und das Gleichgewicht zwischen Degradation und Synthese der Chondrozyten, der extrazellulären Matrix und des subchondralen Knochens destabilisieren [112]. Für die Entstehung der Arthrose sind multiple Faktoren verantwortlich, welche in unterschiedlicher Art und Weise die strukturelle funktionelle Einheit des Gelenkes negativ beeinflussen. Bei der manifesten Arthrose sind morphologische, biochemische, molekulare und biomechanische Veränderungen der Chondrozyten und der Knorpelmatrix nachweisbar. Diese führen zur Erweichung, Auffaserung, zu Ulcerationen, zum Verlust von Knorpelgewebe, zur Sklerosierung und Eburnisation des subchondralen Knochens sowie zur Ausbildung von Osteophyten und subchondralen Zysten. Diese Veränderungen sind klinisch charakterisiert durch Gelenkschmerzen, Bewegungseinschränkung, Krepitation, rezidivierende Ergussbildung und lokale Entzündungsreaktionen [112].

Der klassische Verlust des Gelenkknorpels, wie er bei der Arthrose beobachtet wird, beginnt als fokaler Prozess und lässt sich tierexperimentell beispielsweise durch partielle Menishektomie oder durch Ruptur des vorderen Kreuzbandes induzieren [112]. Diese fokalen pathologischen Prozesse werden beim Menschen am häufigsten bei älteren Patienten beobachtet, können sich ausdehnen und so ein oder mehrere Gelenkkompartimente betreffen sowie Veränderungen der artikulierenden Gelenkflächen

durch Fehlbelastungen induzieren. Die Ausbildung einer idiopathischen Arthrose im Hüft-, Knie- oder Schultergelenk dauert schätzungsweise 20 bis 30 Jahre.

Eine Akzeleration dieser Prozesse kann beispielsweise durch Gelenkverletzungen erfolgen. Aus experimentellen Untersuchungen an Hunden mit induzierter Arthrose des Kniegelenkes durch Resektion des vorderen Kreuzbandes ist bekannt [112], dass die Ausbildung der Arthrose innerhalb von 3-4 Jahren erfolgt. Kommt es nach traumatischen Verletzungen zu Veränderungen des gesamten Gelenkknorpels, sind diese bereits innerhalb von Tagen und Wochen nach dem Unfall in Form eines gesteigerten Knorpelmatrix-Umsatzes nachweisbar. Die Knorpeldegradation wird zuerst in Form von Auffransungen an der Knorpeloberfläche beobachtet. Initial erfolgt eine Spaltbildung parallel zur Knorpeloberfläche. In fortgeschrittenen Arthrosestadien gehen diese bis in tiefere Knorpelschichten und reichen z. T. bis zum subchondralen Knochen. Frühzeitig ist die Bildung von Zellklonen in oberflächlichen Knorpelschichten zu beobachten. Bei fortgeschrittener Arthrose ist eine Abnahme der Knorpelschichtdicke, ausgehend von der Knorpeloberfläche, nachzuweisen. Frühzeitig können hypertrophe Gelenkknorpelreaktionen mit gesteigerter Synthese der Knorpelmatrix nachgewiesen werden. Anschließend folgt eine Phase mit erhöhtem Matrixumsatz und Nettoverlust der Matrixkomponenten. Abschließend werden schwere Schäden oder sogar ein Verlust des Kollagennetzwerkes beobachtet. Pfander et al. [110] konnte zeigen, dass der Anteil der proliferierenden Chondrozyten in humanem arthrotischen Knorpelgewebe in Abhängigkeit des Schweregrades der Arthrose zunahm. Erhöhte Mitoseraten bei arthrotischer Knorpeldegeneration fand auch von der Mark [153].

Die Struktur des Knorpelgewebes ist gelenkspezifisch. Kuettner et al. [66] wiesen Unterschiede der Schichtdicke des humanen Knie- und Sprunggelenkknorpels nach. Sie konnten auch zeigen, dass diese Gewebe in der Anzahl vitaler Zellen pro Masseinheit, der mRNA für Aggrecan, Proteoglycane, Kollagen II und andere Matrixbausteine sowie der IL-1 Rezeptordichte variierten [24, 66, 142].

Die zellulären und molekularen Mechanismen der Gelenkdestruktion bei der Osteoarthritis sind sehr vielfältig. Pap et al. [106] wiesen das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) als ein nicht-kollagenes Knorpelprotein in der Synovialflüssigkeit nach, welches den Knorpelabbau reflektiert. Neben diesen molekularen Mechanismen wurden auch biomechanische Veränderungen von degradativem Knorpelgewebe beobachtet [78].

Im tierexperimentellen Ansatz korreliert die biomechanische Funktion mit strukturellen Veränderungen des Knorpels, wie z.B. die Synthese und Zusammensetzung der Proteoglycane und mit dem Verlust an Hyaluronsäure und link Protein [112].

In der frühen Phase der Arthrose sind hauptsächlich oberflächliche Knorpelschichten geschädigt. Hierbei ist neben der oben beschriebenen Knorpelhypertrophie eine

gesteigerte Synthese von Aggrecanen, vom link protein und auch die Zunahme der Produktion von Prokollagen II in tieferen Knorpelschichten nachzuweisen. Die gesteigerte Aggrecansynthese wird auf eine vermehrte Synthese von Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) und seines Rezeptors zurückgeführt [27, 128]. Bei fortschreitender Knorpeldegradation kommt es zur Spaltung von Matrixmolekülen. Hierbei, insbesondere bei der Spaltung von Kollagen II und Aggrecan, sind verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMP's) von besonderer Bedeutung [3, 113, 154, 159]. Die Expression von MMP's wird durch Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP's) gehemmt, welche während der Arthrose signifikant weniger exprimiert werden [3, 113, 154, 159]. In arthrotisch veränderten Gelenken konnte eine erhöhte Expression verschiedener MMP's nachgewiesen werden. Beispielhaft seien Stromelysin 1 (MMP-3), Gelatinase A (MMP-2) und B (MMP-9), Kollagenase 1 (MMP-1), Kollagenase 2 (MMP-8) und Kollagenase 3 (MMP-13) genannt. Der Funktion der Kollagenase 3 (MMP 13) wird derzeit die größte Bedeutung zugeschrieben [82, 159].

Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene MMP's die Matrixdegradation bei der Arthrose beschleunigen. Die so entstandenen Spaltprodukte haben ihrerseits wiederum Matrix-zerstörende Eigenschaften. So bewirken Fragmente des bei der Arthrose vermehrt synthetisierten Fibronectins durch Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren eine Chondrozyten-vermittelte Knorpelresorption [82, 159]. Diese zellulären Effekte haben auch Einfluss auf die Zytokinproduktion, insbesondere auf die Synthese von Interleukin 1 (IL-1). IL-1 stimuliert die Knorpeldegradation und hat eine essentielle Rolle bei der auto- und parakrinen Fibronectinfragment-vermittelten Knorpelresorption [9]. Neben IL-1 ist auch die Expression des Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) bei der Arthrose erhöht und induziert einen Proteoglycanverlust des Knorpels [155]. Unter in vitro-Bedingungen sind IL-1 und TNF- α potente Aktivatoren der Knorpeldegradation und bewirken eine Stimulation der induzierbaren Nitritoxid-Synthase (iNOS). Diese ist bei Chondrozyten aus arthrotischem Gelenkknorpel vermehrt nachweisbar und führt zu einer vermehrten Produktion von Nitritoxid (NO) [105]. NO bewirkt eine IL-1 vermittelte Hemmung der Aggrecan-Synthese und bewirkt eine Apoptoseinduktion [15]. Die durch NO hervorgerufene Apoptose von Chondrozyten kann durch Hyaluronsäure gehemmt werden, ohne dass hierbei die NO-Synthase gehemmt wird [141]. Krick et al. konnten zeigen, dass die NO induzierte Apoptose glatter Muskelzellen der Pulmonalarterie von Ratten durch Blockade von Kaliumionenkanälen mit Tetraethylammonium (TEA) oder 4-Aminopyridin (4-AP) gehemmt wird [64]. Abgesehen von der Apoptose-induzierenden Wirkung hat NO vermutlich auch protektive Effekte, da

durch Blockade der NO-Produktion eine verzögerte Proteolyse und Degradation erfolgt [112].

Lotz [76] zeigte, dass Zytokine eine wesentliche Ursache für die Stimulation der Chondrozyten nach Knorpelverletzungen sind und gleichzeitig die Entzündungsreaktion des Gelenkes triggern. Die posttraumatische Präsenz von Zytokinen im Knorpelgewebe ist mit einem abnormalen Matrix-Remodelling bzw. -Verlust verbunden. Neben den oben beschriebenen Prozessen sind weitere, als Wachstumsfaktoren bezeichnete Substanzen, für die Regulation der Zusammensetzung der Knorpelmatrix des arthrotisch veränderten Gelenkknorpels verantwortlich. Von Bedeutung sind eine Vielzahl von antiinflammatorischen oder modulierenden Zytokinen der Synovialmembran, des Knorpelgewebes und auch anderer Gewebe [76, 118]. Sie alle tragen in unterschiedlicher Art und Weise zum Anabolismus bei. So wirkt IGF-1 neben der oben beschriebenen Steigerung der Aggrecan-Synthese stimulierend auf die Synthese von Kollagenen, Proteoglycanen und TNF- α . Gleichzeitig hemmt es die Proteoglycandegradation. Der Fibroblast Growth Factor (FGF) regt die Chondrozyten zur Proliferation an [18, 76]. TGF- β stimuliert die Expression von Kollagen II und Aggrecan bei synovialen Fibroblasten aber auch bei Chondrozyten und bewirkt eine Steigerung der Produktion von Plasmin. activator inhibiting protein 1 sowie eine Zunahme der TIMP-Synthese [18, 76, 112]. Durch diese vielfältigen Funktionen der Wachstumsfaktoren erfolgte eine gezielte Steuerung der Proteolyse, der Synthese von Matrixbestandteilen und die Kontrolle der degradativen Effekte verschiedener Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α) [112]. Wang et al. [154] konnten nachweisen, dass TGF- β 1 in der in vitro Kultur humaner Chondrozyten die Akkumulation von Aggrecan und Hyaluronsäure in der zellassozierten Matrix fördert, eine Verminderung der intrazellulären Konzentration von MMP-1 und MMP-3 sowie eine Steigerung von TIMP-1 und TIMP-3 bewirkt.

In verschiedenen in vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Bone Morphogenetic Proteins (BMP) eine wichtige Rolle bei den Reparaturmechanismen des Gelenkknorpels spielen. So ist bekannt, dass BMP's den Metabolismus von Chondrozyten beeinflussen und Makromoleküle der extrazellulären Knorpelmatrix BMP's binden [109]. Häupl et al. konnten zeigen, dass die Expression der BMP's bei rheumatoider Arthritis und bei Arthrose unterschiedlich sind [44]. In arthrotischem Knorpel stimuliert BMP-4 Dosis-abhängig die Proteoglycansynthese, bewirkt eine Zunahme der Kollagen Typ II- und Aggrecan-Expression und hat mitogene Effekte. BMP-2 stimuliert in vitro die Proteoglycan-Synthese, die Kollagen Typ II- und Aggrecan-Expression ohne die Zellproliferation, die Kollagen X-Synthese oder die Osteocalcin-Synthese zu beeinflussen. Die Hypertrophie der Chondrozyten unter in vitro-Bedingungen kann durch Zusatz von

BMP-7 zum Zellkulturmedium verhindert werden [109]. BMP-2 bewirkt in osteochondralen Defekten eine Verbesserung der Neuformierung des Gewebes [131, 132]. Neben der Beeinflussung reparativer Vorgänge sind BMP's aber auch an der Neogenese unterschiedlicher Gewebe beteiligt. Unterschiedliche BMP-abhängige Signalmediatoren (Smad's) regulieren die Osteo- und Chondrogenese. Hierbei erkannten Gross et al. [41], dass die BMP-abhängige Chondrogenese die FGF-abhängige Signalvermittlung involviert. Insbesondere konnten sie zeigen, dass BMP-2 in murinen fibroblastoiden mesenchymalen Vorläuferzellen direkt den FGF-Rezeptor 3 (FGFR3) induziert, während FGFR2 erst später hochreguliert wird. Die Aktivierung von FGFR3 ist jedoch zur Induktion der Chondrogenese ausreichend [41].

Diese zunehmenden neuen Erkenntnisse zur Chondrozyten-Funktion und zum Mechanismus der molekularen Abläufe dieser Prozesse bedingen zwangsläufig ein verbessertes Verständnis der Entstehung und des Ablaufes der Arthrose. Gleichzeitig lassen sich auch Ansätze zur Entwicklung neuer bzw. zur Optimierung bekannter therapeutischer Verfahren ableiten.

4.2 Modulation der Chondrozytenfunktion

Insgesamt gesehen sind aber die Regulationsvorgänge bei der Steuerung der zellulären Prozesse und der spezifischen Stoffwechsellleistungen von Chondrozyten sowohl unter physiologischen Bedingungen wie auch bei der Entstehung und dem Ablauf der Arthrose zwar als sehr komplex erkannt, können jedoch auf Grund der unvollständigen Kenntnisse noch nicht umfassend beurteilt werden. Wesentlich ist dabei die Anwendung von neuen Ergebnissen der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung oder von daraus resultierenden Erkenntnissen bei anderen Fragestellungen. Bisher wenig berücksichtigt für die Entstehung und die Progredienz der Arthrose und ihrer struktur-funktionellen Bedingungen sind die elektrophysiologischen Abläufe und Veränderungen der Chondrozyten-Zellmembran. Ebenso weitgehend unbekannt sind die aus der Modulation elektrophysiologischer Bedingungen resultierenden intrazellulären Veränderungen oder der spezifischen Stoffwechsellleistungen humaner Chondrozyten.

Andererseits liegen Untersuchungen an unterschiedlichen Zellsystemen vor, welche zeigen, dass durch die Aktivität von Ionenkanälen der Zellmembran verschiedene zelluläre Vorgänge beeinflusst bzw. gezielt reguliert werden können [48, 160, 164]. Das betrifft auch einen Zusammenhang der K^+ -Kanalaktivität und der Mitogenese bzw. der Proliferation bei verschiedenen Tumorzellpopulationen [26, 43, 71, 81, 98] oder die Konzentration der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Proliferation bzw.

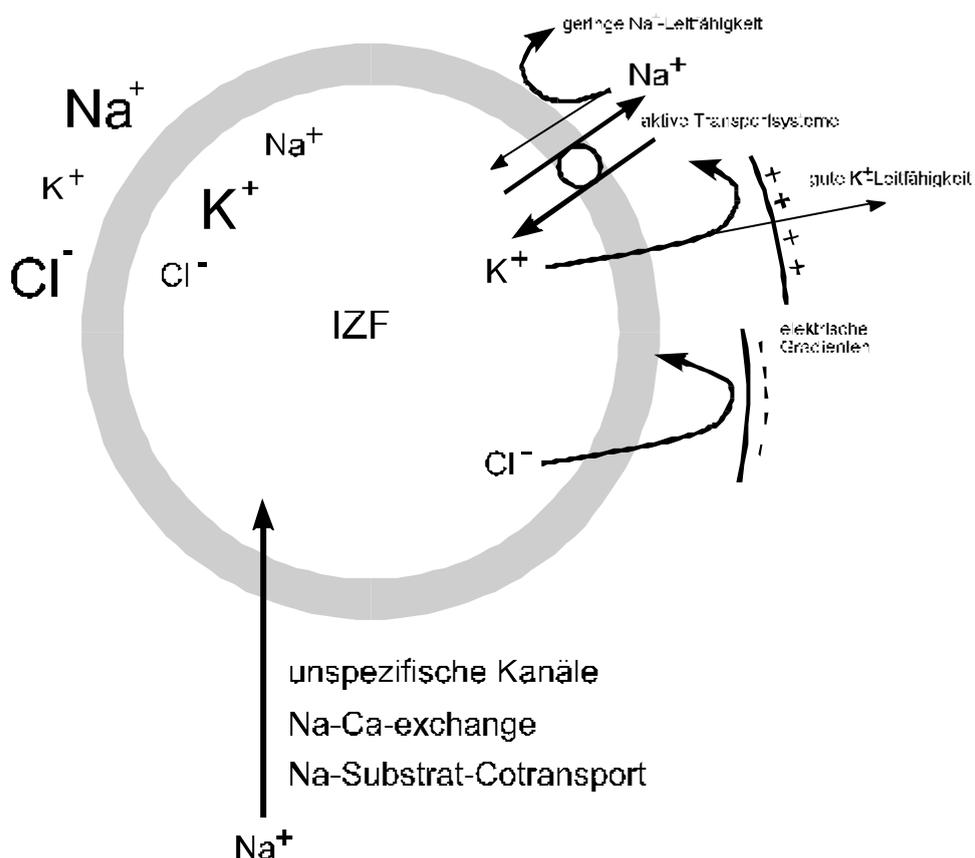
Entdifferenzierung bei humanen Keratinozyten [160, 164]. Die vorliegenden Ergebnisse zur Untersuchung des zellulären Membranpotentials und dessen Beeinflussung durch Ionenkanalmodulatoren belegen, dass sowohl die Proliferation als auch spezifische Stoffwechsellleistungen humaner Chondrozyten durch die elektrophysiologischen Bedingungen beeinflusst oder auch durch Modulation dieser Bedingungen gezielt verändert werden können.

4.2.1 Bedeutung des Membranpotentials

Ein Ruhemembranpotential ist an der Zellmembran aller lebenden Zellsysteme vorhanden. Das Vorhandensein von aktiven und passiven Ionentransportsystemen an der Zellmembran ist wesentliche Voraussetzung für das Entstehen und Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials [48, 127]. Unter physiologischen Bedingungen können an der Zellmembran humaner Chondrozyten keine Aktionspotentiale ausgelöst werden. Sie gehören deshalb zur Gruppe der nicht-erregbaren Zellen.

Abb. 37: Schematische Darstellung der wesentlichen Ursachen für die Entstehung des Membranpotentials. Nach Schmidt und Thews [127]

EZF



An der Zellmembran lebender Zellen sind verschiedene Transportsysteme lokalisiert. Eines der bekanntesten und wohl auch wichtigsten aktiven Transportsysteme ist die Natrium-Kalium-Pumpe, welche unter Verbrauch von ATP einen Natriumausstrom und einen Kaliumeinstrom bewirkt und damit die Ungleichverteilung der Ionen fördert. Dadurch entsteht für die Kaliumionen ein großes Konzentrationsgefälle. Dieses Konzentrationsgefälle wird auch als chemischer Gradient bezeichnet. Der chemische Gradient bewirkt auf Grund der guten Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen einen Kaliumionenausstrom aus der Zelle. Dieser Kaliumionenausstrom wird nun durch das steigende elektrische Potential bzw. den steigenden elektrischen Gradienten gehemmt. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem chemischen und elektrischen Gradienten ein [127] (Abb. 37).

Die Membran vieler Zellen besitzt auch eine gute Leitfähigkeit für Cl⁻-Ionen. Die Cl⁻ Konzentration im Intra- und Extrazellulärraum folgt langfristig dem elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran und damit dem Membranpotential, wenn Cl⁻-Ionen nicht aktiv durch die Zellmembran transportiert werden. Kurzzeitigen Änderungen des Membranpotentials wirken die Cl⁻-Ströme entgegen. Sie sind also auch wesentlich an der Stabilisierung des Membranpotentials beteiligt [127].

Wir haben an humanen Chondrozyten den Nachweis und das Verhalten des Membranpotentials unter dem Einfluss verschiedener Ionenkanalmodulatoren durchflusszytometrisch untersucht (vgl. S 32 ff). Bei dem Membranpotential handelt es sich um ein Gleichgewichtspotential, welches von den Gleichgewichtspotentialen der einzelnen beteiligten Ionen abhängig ist. Die Berechnung des Membranpotentials erfolgt nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung:

$$E = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+} \cdot K^+_a + P_{Na^+} \cdot Na^+_a + P_{Cl^-} \cdot Cl^-_i}{P_{K^+} \cdot K^+_i + P_{Na^+} \cdot Na^+_i + P_{Cl^-} \cdot Cl^-_a}$$

E = Membranpotential

F = Faraday-Konstante

R = Gaskonstante

P = konzentrationsunabhängige Permeabilität

T = Temperatur in Kelvin

i / a = intra- bzw. extrazelluläre Ionenkonzentration

Mit Hilfe der NERNST-schen Gleichung [127] kann das Gleichgewichtspotential für die einzelnen beteiligten Ionen bei Kenntnis der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration berechnet werden (vgl. S. 32 ff).

Als Maß für das Membranpotential diente der Nachweis der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Oxonol VI. Dieser akkumuliert in depolarisierten Zellen. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Oxonol VI konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Ionenkanalmodulatoren konzentrationsabhängig das Membranpotential der Chondrozyten beeinflussen. Für verschiedene Bis-Oxonole wurden lineare Zusammenhänge zwischen der Fluoreszenzintensität und entsprechenden Membranpotentialveränderungen gezeigt [129]. Sie werden deshalb häufig für elektrophysiologische Untersuchungen am Durchflusszytometer eingesetzt. Im Vergleich zur Patch clamp Technik besteht bei dieser Methode der Vorteil, dass sie apparativ weniger aufwendig, aber die Variabilität der Ergebnisse dafür größer ist. Ursache hierfür ist, dass das Durchflusszytometer statt der Konzentration der fluoreszierenden Moleküle die Gesamtmenge des Farbstoffes in der Zelle misst. Das Signal wird demzufolge bei sehr heterogenen Populationen stark von der Zellgröße und -form beeinflusst, da größere Zellen auch vermehrt Farbstoff aufnehmen können [129]. Weiterhin kann die Anzahl hydrophober Bindungsstellen, an die sich Oxonole anlagern, von Zelle zu Zelle stark variieren. Auch die verwendete Farbstoffkonzentration hat Einfluss auf die Messergebnisse [129]. Werden zu hohe Konzentrationen verwendet, sind alle Bindungsstellen besetzt und eine Depolarisation hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität [133]. Häufig stößt die Flowzytometrie bei elektrophysiologischen Fragestellungen auch deshalb an ihre Grenzen, da der Fluoreszenzfarbstoff die hydrophile Phase verlassen und die hydrophoben Bindungsstellen erreichen muß und somit nur solche Membranpotentialänderungen, die über einen Zeitraum von Sekunden oder Minuten erfolgen, detektiert werden können. Kaliumströme sind wesentlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials einer Zelle beteiligt. Der K^+ -Transport erfolgt hierbei über einwärts gerichtete, spannungsabhängige, calziumaktivierte oder ATP-sensitive K^+ -Kanäle. Long und Mitarbeiter [75] wiesen bei Hühner-Chondrozyten einen Ca^{2+} -aktivierten Kaliumionenkanal nach, der sich durch TEA bzw. durch Ba^{2+} blockieren läßt und durch eine katalytische Untereinheit der Proteinkinase A aktiviert werden kann. Martina et al. [80] gelang es, bei Schweine-Chondrozyten einen K^+ -Kanal zu identifizieren, welcher durch Dehnung aktiviert werden kann. Um einen Überblick über die Kaliumkanal-Expression und deren Bedeutung für den humanen Chondrozyten zu gewinnen, wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen mit dem unspezifischen K^+ -Kanalblocker 4 AP durchgeführt. Dieser blockiert spannungsabhängige K^+ -Kanäle [168] und führte in einer Konzentration von 1,0 und 2,0 mmol/l zu einer Hyperpolarisation an der Zellmembran arthrotischer Chondrozyten. Von Endothelzellen ist bekannt, dass calziumaktivierte K^+ -Kanäle existieren, welche bei einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit aufweisen und damit eine

Hyperpolarisation der Zellmembran auslösen [50, 129]. Die Einteilung der Kanäle erfolgt in Kanäle mit hoher (BK_{Ca}), mittlerer (IK_{Ca}) und geringer (SK_{Ca}) Leitfähigkeit. Ob die bei Chondrozyten durch 4-AP ausgelöste Hyperpolarisation durch Blockade dieser calcium-aktivierten K^+ -Kanäle erfolgt, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten. Noulin et al. [102] konnten nachweisen, dass K^+ - Kanäle neben der Steuerung des Membranpotentials auch bei der Volumenregulation der Zelle eine entscheidende Rolle spielen. Diese Eigenschaft ist für die Regulation von Apoptose-Prozessen von Bedeutung.

Neben K^+ -Kanälen spielen auch Anionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Regulation des Membranpotentials. Auswärtsgerichtete Cl^- -Kanäle sind wesentlich für die Volumenregulation der Zelle verantwortlich. Kommt es zu einer Volumenzunahme der Zelle, werden diese so genannten Volumen-regulierenden Anionenkanäle (VRAC) aktiviert [150]. Andererseits werden diese Kanäle auch bei Abnahme des intrazellulären pH-Wertes aktiviert. Das lässt vermuten, dass diese Kanäle auch an der Steuerung des intrazellulären pH-Wertes beteiligt sind. Unter physiologischen Bedingungen werden durch diese VRAC hauptsächlich Cl^- -Ionen transportiert.

Tsuga et al. [146] fanden, dass die Zellmembran von Kaninchen-Chondrozyten durch die Blockade von Cl^- und Anionen-Kanälen mittel SITS depolarisiert wird, aber eine Änderung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration nicht zur Verschiebung des Membranpotentials führt. Sie schlossen daraus, dass das Membranpotential wesentlich durch die Chloridleitfähigkeit beeinflusst wird.

VRAC-Kanäle sind neben Cl^- aber auch für weitere Anionen, wie z.B. Gluconat, Aspartat, Glutamat permeabel. Die Inaktivierung des Kanals erfolgt insbesondere bei einem positiven Membranpotential und kann durch einen sauren extrazellulären pH-Wert sowie eine Erhöhung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration in der Außenlösung beschleunigt werden [150]. Klassische Cl^- -Kanalblocker, wie z.B. DIDS und SITS, blockieren VRAC-Kanäle, wobei der Effekt durch eine Verringerung des äußeren pH-Wertes bzw. eine Positivierung des Membranpotentials verstärkt werden kann. Eine Inhibierung des schwellungsaktivierten Cl^- -Stromes geht mit einer Störung von zellulären Prozessen einher [121] und führt z.T. zu einer vermehrten Aktivierung von Kaliumkanälen, die eine starke Hyperpolarisation der Membran auslösen und somit einen vermehrten Calciumeinstrom induzieren. Nilius et al. [99] schlossen daraus, dass über eine Blockade der Cl^- -Kanäle der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und somit die Ca^{2+} -Signalisierung beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten diese Hypothese nur bedingt untermauern, da die Zugabe von SITS bei Chondrozyten zu einer Hyperpolarisation an der Zellmembran führt. Kommt es als Reaktion auf die Blockade des Cl^- Auswärtsstromes zu einer verstärkten K^+ -Kanalaktivität, ist eine Hyperpolarisation der Zellmembran und damit

ein verstärkter Ca^{2+} -Einstrom zu erwarten. Dieser bewirkt letztlich eine Zunahme der positiven Ladungen an der Innenseite der Zellmembran und damit eine steigende Permeation von Oxonol VI in das Zellinnere. Andererseits könnte die durch Blockade der VRAC ausgelöste unkontrollierte Schwellung der Zelle zu einer Ruptur der Zellmembran führen [103]. Dadurch kommt es zur Abnahme des intrazellulär messbaren Fluoreszenzfarbstoffes.

Neben den K^+ - und Cl^- -Strömen haben auch Natriumionen Einfluss auf das Membranpotential der Zelle. Der Ionentransport erfolgt dabei vor allem über spannungsabhängige Na^+ -Kanäle, welche durch Lidocain wirksam blockiert werden. Von Endothelzellen ist jedoch bekannt, dass mindestens 50% dieser Kanäle bei normalem Membranpotential inaktiviert sind [129]. In Chondrozyten wurden außerordentlich hohe extrazelluläre Na^+ -Konzentrationen nachgewiesen [144, 145]. Diese dienen dem Ladungsausgleich der negativ geladenen Glycosaminglycane, welche als ein wesentlicher Baustein der extrazellulären Knorpelmatrix anzusehen sind [85]. Die Ionenhomöostase zwischen intra- und extrazellulärem Raum wird durch die sogenannten epithelialen Na^+ -Kanäle vermittelt. Sugimoto et al. [139] beschrieben bei Kaninchen-Chondrozyten spezifische Ionenkanäle sowohl für Natrium-, Kalium- als auch für Chloridionen. Diese Ionenkanäle ließen sich durch die Ionenkanalspezifischen Blocker Tetrodotoxin (TTX), Tetraethylammonium (TEA), 4-AP und SITS blockieren.

Im arthrotischen Knorpel werden die Na^+ -Kanäle vermindert exprimiert, da durch die vorausgegangene mechanische Beanspruchung die extrazelluläre Ionenkonzentration verändert wurde [144, 145]. Für die hier dargestellten Ergebnisse wurden Untersuchungen an humanen Chondrozyten aus arthrotischem Knorpelgewebe durchgeführt. Es ist somit davon auszugehen, dass bei den untersuchten Zellen eine verminderte Expression der epithelialen Na^+ -Kanäle vorlag. Trotz dieser verminderten Kanalexpression führte Lidocain zu einer Depolarisation an der Zellmembran der Chondrozyten.

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen werden durch Steuerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Bei verschiedenen Zellsystemen ist die Hauptaufgabe zahlreicher Ionenkanäle die Regulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [95]. Das Membranpotential spielt als Modulator des Ca^{2+} -Einstroms eine entscheidende Rolle. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurden die Effekte des Calciumantagonisten Verapamil auf humane Chondrozyten untersucht. Verapamil blockiert vorwiegend spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Eine Inhibierung des Ca^{2+} -Einstroms verhindert somit eine Depolarisation an der Zellmembran, so dass der Fluoreszenzfarbstoff im Extrazellulärraum verbleibt. An der Zellmembran der untersuchten Chondrozyten kam es unter dem Einfluss von Verapamil in einer Konzentration von

0,25 mmol/l zu der zu erwartenden Hyperpolarisation. Nach Zugabe von 0,5 mmol/l Verapamil waren keine Änderungen des Membranpotentials nachzuweisen. Spätere Untersuchungen zeigten, dass bei diesen Verapamil-Konzentrationen bereits spätapoptotisch-nekrotische Prozesse ablaufen. Zellen, die nekrotisch sind, weisen u.a. auch Zellmembrandefekte auf, so dass keine intrazelluläre Ansammlung von Farbstoffen durchflusszytometrisch nachzuweisen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Verapamil neben der oben beschriebenen Blockade der Ca^{2+} -Kanäle zusätzlich auch K^+ - und Na^+ -Kanäle inhibiert [34, 122, 129, 149]. Inwiefern die Blockade der K^+ -Kanäle in Zusammenhang mit der durch Verapamil verursachten Hyperpolarisation der Zellmembran bei Chondrozyten steht, konnte nicht geklärt werden. Diesbezüglich könnte eine Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration differenziertere Aussagen zum Wirkmechanismus des Verapamils liefern [143].

4.2.2 Regulation der Chondrozytenproliferation

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein Gewebe mit ausgesprochen geringer proliferativer Tendenz [58, 114, 161]. Dies spiegelt sich auch in den Untersuchungen zur Zellzyklusphasenverteilung humaner Chondrozyten wieder (vgl. S. 37 f). Hier befinden sich 95% der untersuchten Zellen in G0/G1. Lediglich 1% der Zellen konnten in der S-Phase und 4 % in der G2/M-Phase lokalisiert werden (vgl. Abb. 11).

Wie jede postmitotische Zelle hat auch der postmitotische Chondrozyt unterschiedliche Möglichkeiten der Entwicklung. In der Dichophase wird entschieden, ob die Zelle weiterhin der Wachstumsfraktion zugeordnet wird oder als postmitotische Zelle die Differenzierung einleitet und damit spezifischen StoffwechsellLeistungen zur Verfügung steht [31, 36, 51, 138]. Dann aktiviert die Zelle Stoffwechselwege, deren Ergebnis die Synthese von Matrixbausteine des hyalinen Knorpels ist. Ist die Differenzierung der Chondrozyten fortgeschritten, ist eine Wiederaufnahme der DNA-Synthese und der Zellteilung nicht mehr möglich. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Proliferation endgültig verloren.

Als weitere Entwicklungsmöglichkeit können postmitotische Zellen in einen Ruhezustand übergehen. Aus dieser G0-Phase sind die Zellen bei Bedarf „reaktivierbar“ um entweder für die Zellproliferation oder für die weitere Differenzierung genutzt zu werden. Diese G0-Phase wird vor allem von Zellen schnell proliferierender Gewebe genutzt. So befinden sich beispielsweise ca. 60% der Keratinozyten in der gesunden Epidermis in dieser G0-Phase [35].

Neben Differenzierung und Ruhephase können die postmitotischen Zellen auch wieder in den Zellzyklus einmünden, also proliferieren. Dann durchlaufen sie die G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus und teilen sich in der Mitosephase. Als Ergebnis entstehen zwei

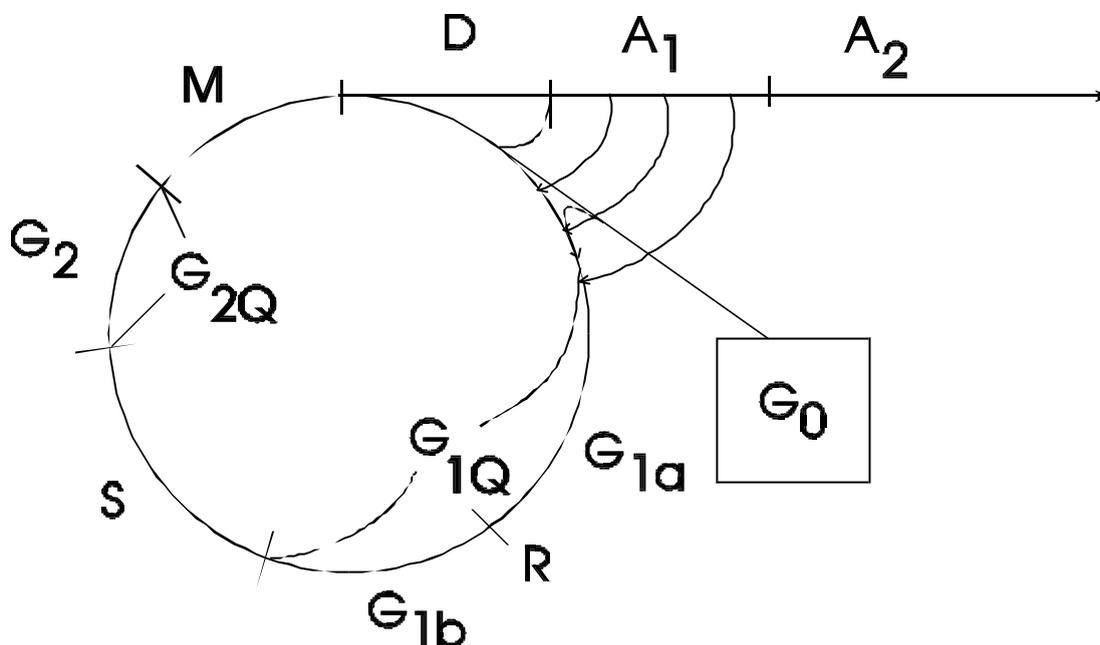
Tochterzellen, die als postmitotische Zellen wiederum differenzieren, proliferieren oder in einen Ruhezustand gelangen (Abb. 38).

Die Entwicklung postmitotischer Zellen erfolgt jedoch nicht rein zufällig. Die Mechanismen dieser Steuerung sind insbesondere bei humanen Chondrozyten nicht vollständig aufgeklärt. Bekanntlich sind verschiedene Steuerproteine (z.B. p53, bcl2), Gewebshormone und Zytokine an der Steuerung der Proliferation und der Syntheseleistungen von Chondrozyten beteiligt [25, 42, 87, 108]. Durch das Protein p53 werden Zellen in der G₁-Phase (G_{1Q}) arretiert. Damit besteht auch länger die Möglichkeit, Schäden an der DNA zu reparieren oder eine Apoptose auszulösen [38, 77]. Bei Keratinozyten ist bekannt, dass auf Grund von proliferativen Reizen die Konzentration von p53 sinkt. Dadurch wird der Arretierungsmechanismus aufgehoben und es treten in sehr kurzer Zeit vergleichsweise viele Zellen in die Mitosephase ein und teilen sich [77]. Diese Tochterzellen stehen anschließend z.B. für die Reparatur von Defekten bei Verletzungen zur Verfügung.

Gewebshormone bewirken in der G₁- und G₂-Phase ein Übertreten von Zellen in Ruhezustände, die als G₀-bzw. G_{2Q}-Phase bezeichnet werden (Abb. 38). Aus diesen Ruhezuständen können die Zellen durch unterschiedliche proliferative Reize wieder in den Zellzyklus einmünden.

Bei Chondrozyten ist eine Vielzahl von Regulatoren insbesondere der Syntheseleistungen bekannt. An dieser Stelle sei auf die bereits oben beschriebenen Funktionen vielfältiger Substanzen MMP's, TIMP's, IGF-1, Interleukine, TNF-a etc. verwiesen. Störungen dieser sehr komplexen, im Detail nicht vollständig überschaubaren Steuerungs- bzw. Regulierungsprozesse der Chondrozytenproliferation und -funktion können als Ursachen für eine frühzeitige Knorpeldegradation gesehen werden.

Abb. 38: Zellzyklus der Proliferation und Differenzierung humaner Zellen
(modifiziert nach Bullough [19])



M	Mitosephase	A ₁	Apophase 1
D	Dichophase	A ₂	Apophase 2
G ₀	G ₀ -Phase	R	Restriktionspunkt
G ₁	G ₁ -Phase	G _{1Q}	G _{1Q} -Phase
S	S-Phase	G _{2Q}	G _{2Q} -Phase
G ₂	G ₂ -Phase		

Bei verschiedenen Zellsystemen wurde nachgewiesen, dass die Proliferationssteigerung durch Modulation der Ionenkanalaktivität auf einen Übertritt von Zellen aus der G₀-Phase des Zellzyklus in die G₁-Phase zurückzuführen ist [77, 160]. Daneben gilt als wahrscheinlich, dass zusätzlich die Arretierung von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus teilweise aufgehoben wird [77, 160]. Als Ergebnis dieser Vorgänge werden vermehrt Zellen in den Zellzyklus eingeschleust, d.h. die Proliferationssteigerung wird durch eine prozentuale Verschiebung von Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen erzielt, also durch Veränderung der Regulation im Ablauf der Zellproliferation. Da sich die untersuchten humanen Chondrozyten überwiegend (ca. 95%) in der G₀/G₁-Phase befanden (vgl. Abb. 11), ist eine Proliferationssteigerung durch vermehrtes Übertreten von Zellen aus G₀ in G₁ bzw. von G₁ in S durchaus nahe liegend. Zusammenhänge dieser Art sind aber sowohl bei humanen als auch bei nicht-humanen Chondrozyten bisher nicht vollständig

geklärt, allerdings ist auf Grund von experimentellen Ergebnissen an anderen Zellsystemen ein Zusammenhang zwischen Ionenkanalaktivität und Mitogenese zu vermuten [26, 43, 71, 81, 98].

Bei verschiedenen Zellsystemen konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation des komplizierten und komplexen Prozesses der Zellproliferation wesentlich über die cytosolische Calciumkonzentration erfolgt. Hierbei führt eine Inhibierung des Ca^{2+} -Einstroms zur Hemmung des Zellwachstums. Für den Calciumantagonisten Verapamil konnten in unterschiedlichen Zellsystemen antiproliferative Effekte nachgewiesen werden. Ursache hierfür ist offensichtlich eine Arretierung der Zellen in G0/G1 [129]. Neben der Blockade der Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ wird vermutet, dass auch andere Mechanismen für die antiproliferative Wirkung von Verapamil verantwortlich sind. Hoffman et al. [49] postulierten, dass die durch Verapamil erzielten Effekte auf einer Hemmung der Proteinkinase C beruhen, welche für die Regulation des Zellwachstums bedeutsam ist. Bei humanen Chondrozyten erfolgte durch Verapamil eine Hemmung der DNA-Syntheserate (vgl. S. 41). Da in diesem Konzentrationsbereich jedoch auch eine Abnahme der vitalen Zellpopulation zu verzeichnen war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die antiproliferative Wirkung des Verapamils unspezifische zytotoxische Effekte widerspiegelt.

Im Verlaufe des Zellzyklus kommt es zu einem rezidivierenden Anschwellen der Zelle. Die Volumenhomöostase wird hierbei durch eine Efflux von Cl^- über volumenregulierte Anionenkanäle aufrechterhalten. Diese VRAC – Kanäle sind somit für die Regulation der Proliferation von entscheidender Bedeutung. Bei verschiedenen Zellsystemen wurden bereits antiproliferative Effekte durch Hemmung der VRAC nachgewiesen [130, 147, 151, 167]. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die volumenbedingten Membranveränderungen die Organisation des Zytoskeletts verändern und so die Aktivität von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, beeinflussen [121]. Des Weiteren wird angenommen, dass diese Proteine in zwei verschiedenen Modifikationen vorliegen und bei Volumenzunahme von einem aktivierten in einen Ruhezustand übergehen. Bei Muskelzellen wurde eine starke Verminderung der Cl^- -Auswärtsströme beim Übergang von der Proliferations- in die Differenzierungsphase nachgewiesen [152]. Shen et al. [135] wiesen nach, dass die Aktivität der volumenregulierten Anionenkanäle bei Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase deutlich abnimmt und bei Wiedereintritt in den Zellzyklus erneut ansteigt. Sie zeigten ebenfalls, dass nach Applikation eines VRAC-Blockers die Zellen in der G0/G1-Phase arretiert werden und schlussfolgerten daraus, dass dieser Ionenkanaltyp an der Kontrolle des Überganges von der G1- in die S-Phase beteiligt ist. Die Tatsache, dass eine Zelle beim Eintritt in die S-Phase verstärkt Aminosäuren und metabolische Substrate, welche u.a.

auch über die VRAC-Kanäle transportiert werden, aufnimmt, untermauert diese Hypothese zusätzlich. Desweiteren wird vermutet, dass die Zellzyklusrate ihr Maximum bei einem schwach sauren, intrazellulären pH-Wert erreicht und die volumenregulierten Anionenkanäle die Proliferation auch über eine Regulation des pH-Wertes beeinflussen [129]. Eine Blockade der VRAC-Kanäle induziert die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes [124]. Andererseits führte bei Astrozyten eine Alkalisierung des Zytoplasmas zur Proliferationshemmung [107].

Humane Chondrozyten zeigen unter dem Einfluss des Anionenkanalblockers SITS eine kurzzeitige Zunahme der DNA-Syntheserate. Nach längerer Inkubationszeit ist eine Hemmung des ^3H -Thymidineinbaus nachweisbar. Diese Ergebnisse sind somit mit den oben dargestellten Ergebnissen anderer Studien nur teilweise in Einklang zu bringen. Andererseits ist bekannt, dass VRAC-Kanalblocker bei anderen Zellsystemen erst nach Zusatz höherer Konzentrationen zur Proliferationshemmung führen [129]. Die Vitalität der humanen Chondrozyten wurde durch die Zugabe des Ionenkanalblockers in diesem Konzentrationsbereich nicht beeinträchtigt, so dass Veränderungen des Zellwachstums aufgrund unspezifischer zytotoxischer Effekte ausgeschlossen werden können.

Ein Zusammenhang von Proliferation und K^+ -Kanalaktivität ist bereits bei verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen worden. So bestätigte sich der Einfluss der Kaliumionenkanalaktivität auf die Mitogenese erstmals 1990 bei Untersuchungen an Schwannschen Zellen und B-Lymphozyten [26]. Untersuchungen an vielen anderen nicht-erregbaren Zellen (z.B. Melanomzellen [98], Astrozytom- und Neuroblastomzellen [71] aber auch an Maus- und humanen Keratinozyten [43, 81]) haben ergeben, dass die Aktivität von Kaliumionenkanälen vermutlich auch bei diesen Zellen einen Einfluss auf die Proliferation hat. Die Kaliumionenkanalöffner Mioxidil und Diazoxid bewirken an in vitro kultivierten Maus-Keratinozyten und Maus-Haarfollikelkulturen eine Stimulation der DNA-Synthese [43]. Die Blockierung der Kaliumionenkanäle durch TEA oder 4Aminopyridin führt zu einer Hemmung der B-Zellproliferation [7]. Bei Melanomzellen nimmt die DNA-Syntheseleistung durch Blockierung der Kaliumionenkanäle unter TEA bzw. cAMP ebenfalls ab [47, 72, 97, 100]. Kaliumkanäle steuern scheinbar aber auch die zelluläre Aufnahme und Abgabe bestimmter Substanzen. So induzieren kaliumkanalblockierende Medikamente nachweislich bei Mastzellen die Histaminfreisetzung sowie die Aufnahme von Calcium in die Mastzelle [30].

Chondrozyten zeigten unter dem Einfluss des K^+ -Kanalblockers 4-AP ein grundsätzlich ähnliches Verhalten, jedoch mit deutlichen Abweichungen im Ablauf der Reaktion. So war nach prolongierter Inkubationszeit mit 4-AP wie bei anderen Zellsystemen eine

Proliferationshemmung zu beobachten, der allerdings eine Phase gesteigerter DNA-Synthese voraus ging (vgl. Abb. 13)

Im Knorpelgewebe haben epitheliale Na^+ -Kanäle eine besondere Funktion. Trujillo et al. [144, 145] konnten nachweisen, dass Chondrozyten aus hyalinem Knorpel über besonders viele Na^+ -Kanäle verfügen. Diese werden zum Ladungsausgleich für negativ geladene Glukosaminglycane benötigt [86]. An nicht-humanen Chondrozyten wurden bereits Na^+ -Kanäle nachgewiesen, welche beispielsweise durch Tetrodotoxin (TTX) blockiert werden konnten [144, 145]. In arthrotisch verändertem Knorpelgewebe werden Na^+ -Kanäle vermindert exprimiert. Dies wird auf die durch die mechanische Beanspruchung des Knorpels veränderte extrazelluläre Ionenkonzentration zurückgeführt. [144, 145]. Ob diese Reduktion von Na^+ -Kanälen tatsächlich primär Folge mechanischer Beanspruchung ist oder erst sekundär durch verstärkte Reaktion auf exogene und endogene Reize aufgrund mangelhafter Struktur-Funktion des Knorpels in Erscheinung tritt, ist derzeit noch nicht geklärt.

Bei verschiedenen Zellsystemen wurden Zusammenhänge zwischen der Na^+ -Kanalaktivität und dem Proliferationsverhalten untersucht mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Tamoxifen, ein kompetitiver Antagonist des Estrogenrezeptors, wird primär zur Behandlung von Mamma-Karzinomen eingesetzt. Tamoxifen blockiert aber auch TTX-sensitive Na^+ -Kanäle und wirkt auf Astrozyten als Proliferationshemmer [136]. Dagegen bewirkt TTX bei Prostata-Karzinomzellen keine Veränderung der Proliferation. Hier löst aber Veratridin, ein Na^+ -Kanalöffner, eine Abnahme der Proliferation um ca. 30% aus [34]. MacFarlane und Sontheimer [79] konnten an Astrozyten zeigen, dass die Expression verschiedener Ionenkanäle Zellzyklusphasen-abhängig ist und bei Zellen, welche in der S-Phase arretiert sind, auf das vierfache ansteigt. Bei Keratinozyten hat die Blockade der epithelialen Na^+ -Kanäle keinen Einfluss auf die Proliferation, ist aber wahrscheinlich für Differenzierungsvorgänge bedeutsam [16]. Ebenso zeigte die Gabe von Lidocain bei B- und T-Lymphozyten keine Veränderung der Mitogenese [14]. Andererseits ist nach Inkubation mit Bretylium Tosylat, einem Na^+ -Kanalöffner, innerhalb von 24 h nach T-Zellaktivierung eine Hemmung des ^3H -Thymidineinbaus nachweisbar [111].

Humane Chondrozyten veränderten ihr Proliferationsverhalten unter dem Einfluss des Na^+ -Kanalblockers Lidocain in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (vgl. Abb. 13). Nachweislich führt eine Inkubation der Chondrozyten vom 2. bis zum 6. Kulturtag zu einer signifikanten Zunahme der Proliferation. Wird die Inkubationszeit bis zum 12. Kulturtag verlängert, wird die Proliferation gehemmt.

4.2.3 Beeinflussung der Apoptose von Chondrozyten

Hinsichtlich der Regulation der Homöostase eines biologischen Systems sind neben den Vorgängen der Zellneubildung auch die Prozesse des programmierten Zelltodes von wesentlicher Bedeutung. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Bewertung des Apoptoseprozesses beruhen auf unterschiedlichen molekularen und morphologischen Veränderungen im Ablauf dieser Vorgänge. Die Flowzytometrie ist ein Verfahren, das durch die Bestimmung von mehreren Parametern eine umfassende Charakterisierung der Apoptose zulässt.

Bekanntlich sind nicht bei jedem Zelltyp und jedem Apoptosereiz alle Apoptosemarker nachweisbar. Deshalb sollten immer mehrere Messverfahren parallel zum Einsatz kommen [62, 90, 120, 149]. Für die Untersuchungen an humanen Chondrozyten wurden drei verschiedene Nachweisverfahren apoptotischer Prozesse ausgewählt. Zunächst wurden Veränderungen von Zellmembranstrukturen nachgewiesen. Im Verlauf der Apoptose kommt es unter dem Einfluss proapoptotischer Signale zur Translokation des Aminophospholipids Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran ohne Verletzung der Membranintegrität [120, 149]. Daher kann Annexin-V, für die Flowzytometrie gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, Ca^{2+} -abhängig an der Außenseite der Membran binden. Durch gleichzeitige Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumjodid (PI) ist parallel die Detektion membrangeschädigter nekrotischer Zellen möglich [120, 149]. Als ein weiterer Parameter wurde die Expression des mitochondrialen Proteins Apo2.7 bestimmt. Der Nachweis mittels des anti-Apo2.7-Antikörpers dient ebenfalls der Detektion von Ereignissen im Frühstadium der Apoptose. Zusätzlich werden jedoch auch spätapoptotisch / nekrotische Zellen miterfasst [120, 149]. Als dritter Parameter wurde die Aktivierung der Caspase 3 am Zytokeratin 18 untersucht (vgl. S. 24 f). Sie ist charakteristisch für eine spätere Phase der Apoptose. Dieses Enzym gehört zur Familie der Cysteinproteasen, die unter Einfluss proapoptotischer Signale eine effektorische Wirkung entfalten. Die Caspase 3 nimmt dabei eine Schlüsselposition ein [11, 120, 149] und führt u.a. durch die Aktivierung einer Endonuklease zu der für die Apoptose charakteristischen DNA-Fragmentierung. Synthetisiert als inaktives Proenzym wird die Caspase durch frühere Prozesse der Aktivierungskaskade in die aktivierte Form überführt, die mit Hilfe des anti-aktive-Caspase-3-Antikörpers (FITC-markiert) nachgewiesen werden kann [11, 120, 149]. Durch die parallele Durchführung dieser Methoden gelingt es, verschiedene durch die Apoptose betroffene Strukturen zu erfassen, anhand derer eine zeitliche Einordnung des Apoptoseprozesses möglich ist.

Für uns stellte sich im Zusammenhang mit der Auslösung und des Ablaufes der Prozesse, die zum Krankheitsbild Arthrose führen die Frage, welche Bedeutung die Modulation der

Wirksamkeit von Ionenkanälen auf die Initiierung von Apoptose bzw. nekrotischem Zelltod bei humanen Chondrozyten hat.

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist für die Regulation vieler zellulärer Prozesse von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden die Effekte des Ca^{2+} -Antagonisten Verapamil, der vorwiegend spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ blockiert, auf humane Chondrozyten untersucht. Dabei ergab sich, dass die Zugabe von Verapamil bei humanen Chondrozyten unter den genannten Kulturbedingungen deutliche zytotoxische Effekte auslöst (vgl. Kapitel 3.6). Aufgrund der großen Streuung der Meßergebnisse konnte jedoch die Zunahme des rein apoptotischen Anteils um bis zu 25 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht statistisch gesichert werden. Dies ist vermutlich auf die Heterogenität der Chondrozyten, welche aus Kniegelenken unterschiedlicher Spender stammten, zurückzuführen. Abgesehen von der Zunahme des apoptotischen Anteils der Zellen spricht auch die signifikante Zunahme des spätapoptotisch / nekrotischen Anteils und der aktivierten Caspase 3 nach 24 h für eine stark vorangeschrittene Zellschädigung. Daraus ist zu folgern, dass bereits vor dem Meßzeitpunkt apoptotische Prozesse stattgefunden haben. Balakumaran et al. [13] zeigten an Thymozyten, dass Verapamil bereits nach 1,5 h apoptotische Effekte auslöst, die nach 3,5 h ihr Maximum erreichen. Aufgrund der schellen Apoptoseinduktion durch Verapamil sind Untersuchungen zur Erfassung dieser apoptotischen Prozesse in kürzeren Zeitabschnitten sinnvoll. Zur Beurteilung der Zytotoxizität der verschiedenen Ionenkanalmodulatoren unter dem Gesichtspunkt eines längerfristigen therapeutischen Einsatzes erfolgten die Untersuchungen nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit. Dabei ergab sich, dass die durch Verapamil bei Chondrozyten ausgelöste Zellschädigung konzentrationsabhängig ist und bereits ab Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu fanden Kameda et al. [56], dass Verapamil bei der Lymphozytenzelllinie U937 in Konzentrationen bis zu 100 $\mu\text{mol/l}$ keine zytotoxischen Effekte auslöste. Allerdings wurden für diesen Konzentrationsbereich auch Hinweise für eine Proliferationshemmung beobachtet [49]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass mit Verapamil in nichttoxischen Konzentrationen Apoptose auch gehemmt werden kann [8]. Eine starke Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt nachweislich zur Aktivierung von Endonukleasen und anderen hydrolytischen Enzymen [54].

Insgesamt gesehen ist die Reaktion von verschiedenen humanen Zellsystemen auf den Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil unterschiedlich. Neben einer zytoprotektiven Wirkung des Ca^{2+} -Kanalblockers Verapamil werden aber auch die zytotoxischen Wirkungen auf die Ca^{2+} -Kanalblockade zurückgeführt. Die Folge einer Ca^{2+} -Kanalblockade ist eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstromes in die Zelle und senkt somit die intrazelluläre Ca^{2+} -

Konzentration, welche eine Störung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse nach sich zieht. Dies kann auch zur Induktion der Apoptose führen [157]. Für Verapamil konnte neben der Ca^{2+} -Kanalblockade zusätzlich die Blockierung von K^+ -Kanälen nachgewiesen werden [34, 122]. Inwiefern die Suppression von K^+ -Strömen in Zusammenhang mit der Auslösung von Apoptose bei humanen Chondrozyten steht, bleibt bisher unbeantwortet. Um der Klärung dieser Fragestellung nachzugehen, bietet sich die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an [143].

Für die Volumenhomöostase einer Zelle sind auswärts gerichtete Cl^- -Kanäle von entscheidender Bedeutung. Die Aktivierung dieser sogenannten volumenregulierten Anionenkanäle (VRAC) erfolgt bei entsprechender Volumenzunahme der Zelle und verhindert so ein unkontrolliertes Anschwellen [96]. Im Gegensatz dazu verursacht eine Hemmung dieser VRAC ein unkontrolliertes Anschwellen der Zelle. Dies geht mit der Störung verschiedener zellulärer Prozesse einher [121].

Die Modulation der Wirksamkeit von Cl^- -Kanälen bei humanen Chondrozyten wurde mit dem bekannten Cl^- -Kanalblocker SITS untersucht. Unter Einsatz von SITS an humanen Chondrozyten konnte nur eine geringe Reduktion der Anzahl vitaler Zellen bei erhöhten Wirkstoffkonzentrationen und nach prolongierter Anwendungszeit beobachtet werden, die anhand der Annexin V / Propidiumjodid-Bestimmung vorwiegend als nekrotische Effekte erklärt werden konnten (vgl. Kapitel 3.6). Kokubun et al. [61] beobachteten bei glatten Gefäßmuskelzellen eine vollständige Kanalblockade durch SITS bei einer Konzentration von 1 mmol/l. Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang von Cl^- -Kanalblockade und Zellschädigung nahe, wobei die ausbleibende Caspase 3-Aktivierung bei unseren Untersuchungen daraufhin deutet, dass die nekrotischen Zellen nicht aus einer zuvor induzierten Apoptose hervorgehen und somit diese Form des Zelltodes unter SITS-Einfluss vermutlich keine entscheidende Bedeutung hat. Die von Okada et al. [104] gemachte Beobachtung, dass eine Volumenvergrößerung zur Ruptur der Zelle und damit zur Nekrose führt, unterstützt diese Hypothese. Eine Blockade von Cl^- -Kanälen bewirkt aber auch eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [96] sowie eine vermehrte Aktivierung von K^+ -Kanälen, um die Regulierung des Zellvolumens zu gewährleisten. Folge dessen ist eine Hyperpolarisierung der Zellmembran, die durch die Zelle mit einem gesteigerten Calciumeinstrom beantwortet wird. Eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration kann dann ihrerseits neben der Apoptose auch nekrotische Prozesse induzieren [169]. Welche Form der Zellschädigung auftritt, hängt dabei vom Maß der Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung ab.

Die Volumenhomöostase wird neben den auswärts gerichteten Cl-Kanälen auch über K⁺-Kanäle gesteuert. Bei humanen Chondrozyten wird durch Blockierung spannungsabhängiger K⁺-Kanäle mit 4-AP konzentrationsabhängig eine Apoptose induziert (vgl. Kapitel 3.6). Die Tatsache, dass der Anteil Annexin-V-FITC positiver Zellen im Vergleich zu den PI-positiven Zellen vermindert war, deutet auf eine frühe Apoptoseinduktion hin, die deutlich vor dem Zeitpunkt der Messung stattgefunden hat. So befand sich der überwiegende Teil der geschädigten Zellen bereits im spätaoptotischen Stadium bzw. im Übergang zur Nekrose. Der Nachweis der aktivierten Caspase 3 unterstreicht diese Beobachtung. Bei Hepatoblastomzellen ließ sich bereits nach 16 stündiger Inkubationsdauer von 4-AP in einer Konzentration von 2,5 mmol/l eine Zunahme des apoptotischen Anteils der Zellpopulation nachweisen [60]. Aufgrund des Ausmaßes der Zellschädigung an humanen Chondrozyten muß nach 48 stündiger Inkubation mit 4-AP in einer Konzentration von 1 mmol/l oder höher auf eine toxische Reaktion der Zellen geschlossen werden.

K⁺-Kanäle spielen sowohl bei der Steuerung des Membranpotentials als auch bei der Volumenregulierung [102] eine entscheidende Rolle. Im Zusammenhang damit wird die Auslösung von Apoptose unter 4-Aminopyridin-Einfluss gesehen. Durch die Blockade der K⁺-Kanäle kommt es zum Anstieg der intrazellulären K⁺-Konzentration. Dies hat eine Depolarisierung der Zellmembran zur Folge, welche zur Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen (NSCC) führt [60]. Über diese gelangt vermehrt Ca²⁺ in die Zelle. Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zur Aktivierung hydrolytischer Enzyme, hat Einfluss auf den Energieverbrauch der Zelle sowie auf die Zerstörung des Zytoskeletts [94]. Die Apoptoseinduktion von 4-AP beruht demzufolge auf der durch K⁺-Kanalblockade vermittelten Wirkung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Eine ähnliche Vermutung formulierten Okada et al. [104] im Zusammenhang mit der veränderten Zellvolumenregulierung nach 4-AP-Behandlung. Durch die Suppression der auswärts gerichteten K⁺-Ströme [21] kommt es im weiteren Verlauf zur osmotischen Schwellung der Zelle. Die Aktivierung von dehnungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen führt zum Einstrom von Ca²⁺ [137] und entsprechend zum Apoptose-induzierenden Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine Aussagen darüber zu, welcher Mechanismus der Apoptose in den mit 4-AP behandelten Chondrozyten zugrunde liegt. Es ist jedoch zu vermuten, dass sowohl die Veränderung der Volumenregulation als auch des Membranpotentials an der Induktion der Apoptose bei humanen Chondrozyten beteiligt sind.

Chondrozyten verfügen über ungewöhnlich hohe extrazelluläre Na⁺-Konzentrationen [144, 145], die zum Ladungsausgleich für negativierte Glucosaminglycane dienen [86]. Dieses Ionengleichgewicht wird über epitheliale Na⁺-Kanäle (ENaC) vermittelt. Es wird angenommen, dass sie auf Grund einer vorangegangenen mechanischen Beanspruchung und der damit verbundenen Änderung des Ionenmilieus in arthrotischem Knorpel vermindert exprimiert werden [144, 145].

Für den spannungsabhängigen Na⁺-Kanalblocker Lidocain konnten an humanen Chondrozyten nur nach längerer Inkubationszeit zellschädigende Effekte nachgewiesen werden, die sich in der Erhöhung des Anteils Annexin-V bzw. PI-positiver Zellen äußerte. Allerdings lagen dabei die wirksamen Konzentrationen um bis zu 500-fach höher als die von Raley-Susman et al. ermittelten Werte zur Na⁺-Kanalblockade an Neuronen durch Lidocain [117]. Da für unsere Untersuchungen ausschließlich humane Chondrozyten aus arthrotisch verändertem Knorpelgewebe verwandt wurden, ist zu vermuten, dass bei den untersuchten Chondrozyten eine verminderte Expression der ENaC vorlag und diese in Zusammenhang mit den geringfügigen Effekten des Lidocain gebracht werden kann. Die Abnahme der Vitalität nach 48 h wird bedingt durch die entsprechend hohen Konzentrationen und der langen Inkubationszeit, die zusammen letztlich doch eine Störung zellulärer Abläufe hervorrufen. Es bleibt unklar, ob die vergleichsweise geringe Toxizität von Lidocain auf der verminderten Expression der Kanäle beruht oder ob der Funktionszustand der Chondrozyten durch die Na⁺-Kanalblockade generell nur geringfügig beeinflusst wird.

4.3 Modulation spezifischer StoffwechsellLeistungen von Chondrozyten

4.3.1 Modulation der CD44-Expression

Neben der Zellneubildung und dem programmierten Zelltod sind Fragen nach der Regulation von spezifischen Zellfunktionen von entscheidender Bedeutung für die Dynamik eines biologischen Systems. Wesentlich für die Funktion des Knorpels sind u.a. der Gehalt und die Synthese von Hyaluronsäure in ausreichender Menge und Qualität. Die Bindung von Hyaluronsäure an der Zelloberfläche wird hauptsächlich durch ein membraninterkalierendes Glykoprotein (80-95 kD), den CD44-Rezeptor, gesteuert. Dieser Rezeptor wird von Chondrozyten exprimiert [2] und interagiert mit Zytoskelettproteinen, ist an Vorgängen der Zellinteraktion, der Zellmigration, der Funktion des Immunsystems [17] und anderen physiologischen Prozessen beteiligt. Für die Zellinteraktion sind neben CD44 noch RHAMM (Receptor for Hyaluronan-mediated Motility) und ICAM-1 als Oberflächenrezeptoren von Bedeutung [4].

Der CD44-Rezeptor spielt auch bei verschiedenen Tumoren für die Regulation von Wachstum, der Matrixdegradation aber auch für die Angiogenese eine entscheidene Rolle [57, 59, 63, 70, 158]. Bei Tumoren konnte insbesondere eine gesteigerte Expression von CD44v5 und bzw. oder CD44v6 nachgewiesen werden [67-69]. Während der embryonalen Entwicklung ist CD44 für die Morphogenese und Organogenese bedeutsam [148].

Das Gen dieses Rezeptors ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 20 Exons, von denen immer 10 exprimiert und als CD44H bezeichnet werden. Die anderen 10 kodieren extrazelluläre Regionen (genannt v1-v10), die unterschiedliche Splicevarianten darstellen. Diese Splicevarianten entstehen durch unterschiedliches Spleißen der mRNA mit darauffolgender Modifikation durch Glycolyse [67]. CD44-Isoformen kommen in unterschiedlichen humanen Geweben vor (z.B. Tonsillen, Schilddrüse, Brust, Prostata, Cervix, Ösophagus, Epithel, Haut) [63, 158]. Auch an der Zellmembran humaner Chondrozyten wurde bereits der CD44-Rezeptor nachgewiesen [2]. Die CD44-Expression der Chondrozyten im hyalinen Knorpelgewebe ist für die Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase von entscheidender Bedeutung [23]. Sie ist wesentliche Voraussetzung für die Bindung von Hyaluronsäure [52] und ist bei der Gelenkentwicklung von Bedeutung [28]. Die im Knorpelgewebe gebundene Hyaluronsäure ist in der Lage, die entsprechenden Funktionen als Matrixbaustein zu erfüllen [2].

So ist bekannt, dass der Schutz der Matrix durch Bindung von Hyaluronsäure an die CD44-Rezeptoren möglich ist [53, 92]. Des Weiteren wird diskutiert, ob CD44 auch als Adhäsionsrezeptor für andere Matrixbausteine (z.B. Kollagene und Fibronectin) fungiert [125]. Takagi et al. stellten fest, dass der CD44-Rezeptor auch eine wichtige Rolle während des Ablaufes von Entzündungsprozessen spielt [140]. Auch ist die Zunahme der CD44-Rezeptorexpression bedeutsam bei der Knorpeldegradation bei der Arthrose und der rheumatoiden Arthritis [93, 126, 140]. Die Bindung von Hyaluronsäure spezifische Rezeptoren CD44 und CD54 (ICAM-1) löst bei Chondrozyten aus arthrotischem Knorpel anti-apoptotische Effekte aus [73].

Andererseits gibt es Hinweise, dass die durch IL-1 β , TNF- α oder rheumatoide synoviale Fibroblasten verursachte Zerstörung der Knorpelmatrix durch Vorbehandlung der Chondrozyten mit anti-CD44 verringert wird [53, 92]. Eine Verminderung der CD44-Expression, wie sie auch durch Ionenkanalmodulation erzielt werden kann, könnte somit auch einen Schutz vor der Degeneration der Knorpelmatrix bewirken [23, 86, 92], ist aber andererseits nachweislich gleichzeitig auch mit dem Verlust an proteoglykanreicher Matrix verbunden [53, 92]. Chow et al. [22] konnten nachweisen, dass die katabole Wirkung von Fibronectin und IL-1 α zu einem Anstieg der CD44-H-Expression boviner Chondrozyten führt. Sie schlussfolgerten daraus, dass Mechanismen, die den Katabolismus von Chondrozyten beschleunigen, mit einer Steigerung der CD44-Rezeptorexpression verbunden sind. Ähnliche Zusammenhänge konnten Nishida et al. nachweisen [101].

Die vorliegenden Befunde belegen, dass durch gezielte Beeinflussung der Wirksamkeit von Ionenkanälen die CD44-Expression humaner Chondrozyten moduliert werden kann. So führt die Blockade der oben beschriebenen Na⁺-Kanäle mit Lidocain nach 24- und 48-stündiger Inkubation zu einer Zunahme der CD44-Expression auf 143% bzw. 130%. Die Zugabe von 4-AP steigert die Expression des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 auf 143% bzw. 135%. Nach 72 h Inkubationszeit waren diese Effekte nicht mehr nachweisbar. Eine Blockade der Cl⁻-Kanäle mit SITS oder die Zugabe des Ca²⁺-Antagonisten Verapamil riefen dagegen keine Veränderungen der CD44-Rezeptorexpression humaner Chondrozyten bis zu einer Inkubationszeit von 72 h hervor. Anders stellen sich die Untersuchungsergebnisse nach noch längerer Inkubationszeit dar. Die oben beschriebenen Veränderungen der CD44-Rezeptorexpression durch 4AP und Lidocain treten nach kurzer Einwirkungszeit auf, sind jedoch bei prolongierter Einwirkung nicht mehr nachweisbar. Eine Ca²⁺-Kanalblockade durch Verapamil bewirkt bei humanen Chondrozyten am 6. und 12. Kulturtag eine signifikante Abnahme der CD44-Expression auf bis zu 55% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei noch längerer Inkubation

mit Verapamil zeigten die Chondrozyten keine Veränderungen der Rezeptorexpression mehr. Anders verhielten sich die Zellen unter dem Einfluss des Cl⁻-Kanalblockers SITS. Hier zeigten sie sowohl nach 6, 12 und auch nach 18 Kulturtagen eine Verminderung der CD44-Rezeptorexpression. Unterschiede der Rezeptorexpression an den jeweiligen Messzeitpunkten waren nicht zu ermitteln, so dass davon auszugehen ist, dass bei humanen Chondrozyten die CD44-Expression nach Hemmung der Anionenkanäle unter dem Einfluss von SITS kontinuierlich herabgesetzt ist.

Die durch Ionenkanalmodulation an humanen Chondrozyten ausgelösten Veränderungen der CD44-Expression lassen die Schlussfolgerung zu, dass CD44-vermittelte Prozesse, wie z.B. Signaltransduktionen und Steuerung von Mechanismen der Zellinteraktion, über die Aktivität von Ionenkanälen reguliert werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, durch Steuerung der Ionenkanalaktivität bei humanen Chondrozyten über eine Beeinflussung der CD44-Rezeptorexpression die Matrixdegeneration des hyalinen Knorpels sowie die Bindung der Hyaluronsäure im Knorpelgewebe zu beeinflussen. Damit könnte ein therapeutischer Ansatz zur gezielten Behandlung der Funktion der Knorpelmatrix über die Steuerung der Ionenkanalaktivität gegeben sein.

4.3.2 Modulation der Kollagensynthese

Hauptbestandteil des hyalinen Knorpelgewebes ist die so genannte extrazelluläre Matrix. Sie besteht aus einer Reihe unterschiedlicher Polysaccharide und Proteine, die von den Chondrozyten synthetisiert und exprimiert werden und sich dann in enger Verbindung mit den Zellen zu einem strukturierten Maschenwerk zusammen lagern. Die Chondrozyten, welche die Makromoleküle der extrazellulären Matrix bilden, tragen auch zu ihrer Strukturierung bei. Es werden zwei Hauptklassen der extrazellulären Makromoleküle unterschieden, zum einen die Glucosaminglycane, die zu den Polysacchariden gehören und andererseits die Faserproteine [6].

Glucosaminglycane sind unverzweigte Polysaccharidketten, die auf Grund ihrer Sulfat- und Carboxylgruppen eine starke negative Ladung tragen. Die Glucosaminglycane werden in vier Hauptgruppen unterteilt: 1. Hyaluronan, 2. Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat, 3. Heparansulfan und Heparin und 4. Keratansulfat. Alle Glucosaminglycane liegen mit Ausnahme von Hyaluronan an Proteinen gebunden vor und werden als Proteoglycane bezeichnet. Glucosaminglycane wirken anabol auf in vitro kultivierte Chondrozyten. Kawasaki et al. konnten nachweisen, dass Hyaluronsäure die Chondrozytenproliferation sowie deren Chondroitinsulfatsynthese steigert [58].

Wegen der hohen Dichte von negativen Ladungen der Glucosaminglycane ziehen sie eine Wolke osmotisch aktiver Kationen (z.B. Na^+) an und saugen so auch große Wassermengen in die extrazelluläre Matrix. Der so entstehende Quelldruck im Knorpelgewebe, auch Turgor genannt, dient als Widerstand gegenüber den einwirkenden Druckkräften. Im Gegensatz dazu widerstehen Kollagenfibrillen angreifenden Zugkräften. Kollagene gehören zu den Faserproteinen, die neben den Glucosaminglycanen die zweite Hauptklasse der extrazellulären Makromoleküle bilden. Zu den Faserproteinen gehören Strukturproteine wie Kollagene und Elastin sowie Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin). Kollagene werden als Prokollagene von den jeweiligen Bindegewebszellen, so auch von Chondrozyten, synthetisiert und exprimiert. Im extrazellulären Raum erfolgt durch proteolytische Enzyme die Umwandlung in Kollagenmoleküle, welche sich zu Kollagenfibrillen und schließlich zu Kollagenfasern zusammenlagern [6].

Bei Säugetieren sind Kollagene Hauptbestandteile von Haut und Knochengewebe sowie mit 25% des Gesamtproteins die am häufigsten vorkommende Proteinklasse. Charakteristisches Merkmal eines Kollagenmoleküls ist die lange, steife dreisträngige Helixstruktur, welche von drei Polypeptidketten (so genannte α -Ketten), die sich zu einer Superhelix umeinander winden, gebildet wird [6].

Im hyalinen Knorpelgewebe sind verschiedene Kollagene (Typ II, IX, XI) nachgewiesen worden [83]. Auch hier erfolgt die Synthese der Kollagene bzw. Prokollagene durch Chondrozyten als spezifische Bindegewebszellen. Kollagene sind zusammen mit den Glucosaminglycanen für die biomechanische Stabilität des Knorpelgewebes verantwortlich. Schätzungsweise 95% der im Knorpelgewebe vorhandenen Kollagene sind Kollagen Typ II. Chondrozyten-spezifisch ist die Änderung der Kollagenexpression im Rahmen der Arthrose, aber auch nach Herauslösen der Zellen aus der extrazellulären Matrix ex vivo [45, 153] Chondrozyten in initialen Arthrostadien sind durch eine gesteigerte Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglycanen gekennzeichnet. Die fortgeschrittenen Arthrostadien sind durch einen Verlust der Kollagen II-Synthese und eine Steigerung der Synthese von Kollagen Typ III und Typ VI charakterisiert [153]. Neben der Arthrose führt auch vermehrte statische oder dynamische Belastung des Knorpelgewebes bzw. der Chondrozyten zu Veränderungen ihrer Syntheseleistungen [88]. So konnten Ragan et al. [115] zeigen, dass mit zunehmender statischer Belastung in Abhängigkeit der zeitlichen Dauer der Krafteinwirkung die Synthese von Aggrecan und Kollagen Typ II vermindert wird. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte weiterhin nachweisen, dass im vergleichbaren Versuchsansatz eine dynamische Kompression zur Steigerung der genannten Bausteine der extrazellulären Matrix führten [116]. In einem anderen Versuchsmodell, welches kurzzeitige mechanische Druckkräfte von mehr als 20 MPa

verursacht, wie sie bei Verletzungen von Gelenken vorkommen, konnte gezeigt werden, dass eine solche Verletzung des Knorpels in Abhängigkeit der einwirkenden Kräfte zu einer Gewebsschwellung, einer Abnahme der Glucosaminglycan-Synthese, steigenden Nitritkonzentrationen und letztlich auch eine Induktion der Apoptose bewirken [74].

Neben statischer und dynamischer Belastung führen auch Veränderungen der Ionenkonzentrationen verschiedener Ionen zu Veränderungen der Syntheseleistungen von Chondrozyten. Flechtenmacher et al. beschrieben, dass bei bestimmten Ca^{2+} und Zinkionenkonzentrationen die Kollagensynthese von Chondrozyten stimuliert wird ohne die Proteoglycansynthese oder die Prolifartionsrate der Zellen zu verändern [33]. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse der Untersuchungen zur Steuerung der Kollagenexpression humaner Chondrozyten durch Modulation der Ionenkanalaktivität zu sehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die Kollagen Typ II-Expression durch Veränderung der Ionenkanalaktivitäten und den damit verbundenen Verschiebungen des Membranpotentials reduziert werden kann (vgl. Abb. 36). Zur endgültigen Klärung dieser Abläufe sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.4 Schlussfolgerungen

Die Arthrose stellt das Ergebnis verschiedener mechanischer und biologischer Prozesse dar, welche das funktionelle Gleichgewicht zwischen Degradation und Synthese der Chondrozyten, der extrazellulären Matrix und des subchondralen Knochens destabilisieren und damit neben dem Untergang des Gelenkknorpels strukturelle Veränderungen aller Gelenkstrukturen hervorrufen.

Im klinischen Alltag stehen derzeit verschiedene Behandlungsverfahren zur Verfügung. Neben nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAR) und sogenannten Chondroprotektiva, wie intraartikulär applizierbare Hyaluronsäure-Präparate und orale Glucosaminglycane, stehen auch andere medikamentöse, physikalische, orthopädietechnische und letztlich zahlreiche operative Therapieverfahren zur Verfügung. Ziel dieser Therapiemöglichkeiten ist die Verhinderung des Fortschreitens bzw. eine Hemmung der Progredienz der Erkrankung. Keine der bisher vorhandenen Therapieoptionen führt zu einer Heilung der Arthrose im Sinne einer restitutio ad integrum des hyalinen Gelenkknorpels und der übrigen betroffenen Gelenkstrukturen. Die in jüngster Vergangenheit erworbenen neuen feinstrukturellen Erkenntnisse über biochemische Abläufe der Arthroseentstehung und Progredienz haben zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten geführt.

Andererseits wurden bisher jedoch verschiedene neue Erkenntnisse der biomedizinischen Grundlagenforschung für diese Fragestellungen nicht ausreichend berücksichtigt. Hierzu zählt auch die von anderen Zellsystemen bekannte Beeinflussung von Zellmembraneigenschaften und die daraus resultierenden Veränderungen bestimmter Funktionszustände der Zelle. Wir konnten zeigen, dass das an der Zellmembran humaner arthrotischer Chondrozyten anliegende Ruhemembranpotential durch verschiedene Ionenkanal blockierende Substanzen verändert wird. Diese Änderung der Ionenkanalaktivität führt zur Modulation unterschiedlicher Chondrozyten-Funktionen. So lässt sich durch eine gezielte Steuerung der Ionenkanalaktivität das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Chondrozyten modulieren. Andererseits können aber auch spezifische Stoffwechselleistungen, die für die Funktion des Chondrozyten und damit auch des hyalinen Knorpelgewebes von entscheidender Bedeutung sind, gezielt reguliert werden.

Aus therapeutischer Sicht ist eine anabole Beeinflussung des Chondrozyten und damit des hyalinen Knorpelgewebes wünschenswert. Dies könnte dazu dienen, die Proliferation und Stoffwechselleistungen der Chondrozyten im arthrotisch veränderten Knorpel zu verbessern und damit eine feinfunktionelle aber auch biomechanisch wirksame Stabilisierung des Knorpelgewebes zu erzielen. Andererseits könnten katabole

Stoffwechselsituationen für die Chondrozyten, eine Degradation des hyalinen Knorpelgewebes und die damit verbundene Induktion der Arthrose verhindert werden. Bei der Interpretation der vorliegenden Befunde unter den Gesichtspunkten der Arthrosetherapie bzw. der Beeinflussung des Ablaufes der Erkrankung sind die mit Lidocain erzielten Ergebnisse am interessantesten. Unter dem Einfluss von Lidocain in sehr geringen Konzentrationen zeigten humane Chondrozyten unter in vitro Bedingungen eine temporäre Proliferationssteigerung sowie eine Zunahme der CD44-Rezeptorexpression. Andererseits waren nur bei sehr hohen Lidocain-Konzentrationen geringe zytotoxische Effekte nachweisbar. Diese durch Lidocain hervorgerufenen biochemischen Veränderungen, zusammen mit den bekannten analgesierenden Eigenschaften, lassen diese Substanz für die intraartikuläre Behandlung der Arthrose mit ihrem teils sehr schmerzhaften klinischen Erscheinungsbild als prädestiniert erscheinen. Jedoch wird Lidocain aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften und der damit verbundenen kurzen intraartikulären Verweildauer allein keine feinstrukturellen Veränderungen am Chondrozyten und damit des hyalinen Gelenkknorpels hervorrufen können. Vielmehr könnte man sich die oben geschilderten Effekte des Lidocains durch Bindung an Trägermaterialien zu nutze machen, welche eine retardierte Freisetzung der Substanz zulassen und über eine prolongierte Verweildauer im Gelenk verfügen. In diesem Zusammenhang zeigen erste weiterführende Untersuchungsergebnisse nach Bindung von Lidocain an hochmolekulare Hyaluronsäure über ein spezielles Verfahren einen retardierten Freisetzungsmechanismus von Lidocain. Hyaluronsäure bietet sich als Trägermaterial an, da es ein wesentlicher Baustein der extrazellulären Knorpelmatrix ist, in Abhängigkeit des eingesetzten Molekulargewichts über eine Gelenkverweildauer von mehreren Tagen verfügt, als Radikalfänger fungiert und bereits separat erfolgreich zur Therapie der Arthrose eingesetzt wird.

Die hier dargestellten Befunde sind bisher als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu verstehen, die der Erarbeitung therapeutischer Optionen für die Arthrosebehandlung durch gezielte Steuerung der Aktivität spezifischer Ionenkanäle dienen.

5 Zusammenfassung

Die Arthrose ist eine Volkskrankheit, welche für den Patienten und die Gesellschaft extrem hohe Kosten verursacht und steigende Inzidenzraten aufweist. Für die Entstehung und Progredienz dieser degenerativen Gelenkerkrankungen sind verschiedene Faktoren von Bedeutung, u.a. der Body Mass Index, berufliche – und Freizeitaktivitäten oder verschiedene präarthrotische Deformitäten von Bedeutung. Neben diesen mechanischen Faktoren sind aber in jüngster Vergangenheit auch verschiedene Befunde über biochemische und molekulare Abläufe beschrieben worden, welche zu einer Destabilisierung des Gleichgewichtes zwischen Degradation und Synthese von Chondrozyten, der extrazellulären Matrix und des subchondralen Knochengewebes führen. Beispielhaft sei hier auf die Einflüsse von Matrixmetalloproteinasen (MMP's), deren Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMP's)), verschiedener Interleukine und anderer Zytokine sowie unterschiedlicher Bone Morphogenic Proteins (BMP's) verwiesen (vgl. Kap. 4.1 , S. 69 ff.). Diese feinstrukturellen biochemischen Erkenntnisse haben zu unterschiedlichen neuen Ansatzpunkten der Therapie der Arthrose geführt.

Andere Erkenntnisse der naturwissenschaftlich – medizinischen Grundlagenforschung sind in ihrer Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese der Arthrose oder deren Prophylaxe und Therapie bisher noch nicht ausreichend berücksichtigt worden. So ist die Beeinflussung von spezifischen Zellmembraneigenschaften und die daraus resultierenden Veränderungen bestimmter Funktionszustände der Chondrozyten, wie sie von Untersuchungen an anderen Zellsystemen bereits bekannt sind, bisher nur unzureichend untersucht.

Um diese möglichen Zusammenhänge besser zu verstehen, wurden Untersuchungen an humanen arthrotisch veränderten Chondrozyten unter elektrophysiologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Dieses Knorpelgewebe fiel bei der Implantation von Knieendoprothesen an. Nach enzymatischer Isolierung der Chondrozyten erfolgte eine Monolayer-Kultivierung. Der Einfluss der Ionenkanalmodulierenden Testsubstanzen 4-Aminopyridin (4-AP), Lidocain, Verapamil und SITS (4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure) auf das Ruhemembranpotential erfolgte mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Oxonol VI, der im Zytoplasma depolarisierter Zellen akkumuliert wird und seine Fluoreszenzintensität membranpotentialabhängig verändert. Chondrozyten zeigten unter dem Einfluss von 4AP, Verapamil und SITS eine Abnahme des Membranpotentials

(Hyperpolarisation). Lidocain dagegen führte in einer Konzentration von 0,1 mmol/l zur Depolarisation der Chondrozyten-Zellmembran.

Ebenfalls durchflusszytometrisch erfolgte die Bestimmung der DNA-Verteilungsmuster arthrotischer Chondrozyten. Hierzu wurde nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen die Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid, einem Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenzintensität proportional dem DNA-Gehalt der Zelle ist, bestimmt. Es zeigte sich, dass ca. 95% der untersuchten Zellen innerhalb der G0/G1-Phase, 1% in der S-Phase und 4% in der G2/M-Phase vorlagen. Dies spricht für eine ausgesprochen geringe proliferative Tendenz der untersuchten Chondrozyten.

Das Proliferationsverhalten der humanen Chondrozyten wurde durch Messung der ^3H -Thymidineinbaurate erfasst. Es konnte eine kontinuierliche Zunahme der Proliferation bis zum 12. Kulturtag beobachtet werden. Anschließend sank die Proliferation bis zum 21. Kulturtag ab. Der Na^+ -Kanalblocker Lidocain, der K^+ -Kanalblocker 4-AP sowie der Cl^- - und Anionenkanalhemmer SITS führten zu einer temporären Proliferationssteigerung. Diese war unter dem Einfluss des Ca^{2+} -Antagonisten Verapamil nicht nachweisbar.

Neben den Vorgängen der Zellneubildung ist für die Homöostase eines biologischen Systems auch der programmierte Zelltod (Apoptose) von zentraler Bedeutung. Bekanntermaßen sind nicht bei jedem Zelltyp und jedem Apoptosereiz alle Apoptosemarker nachweisbar. Deshalb wurde zum Nachweis von Apoptoseprozessen bei humanen Chondrozyten die Translokation des Phosphatidylserins (Annexin V), das mitochondriale Membranprotein Apo2.7 und die Caspaseaktivität am Zytokeratin 18 durchflusszytometrisch bestimmt. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass bei humanen Chondrozyten unter dem Einfluss der Testsubstanzen das Apoptoseverhalten verändert wird. Durch Ca^{2+} -Blockade kommt es zur Hemmung des Ca^{2+} -Einstromes in die Zelle. Dies bewirkt eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und führt somit zur Störung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse. Bei Chondrozyten, welche unter dem Einfluss des Ca^{2+} -Kanalblockers Verapamil kultiviert wurden, waren frühzeitig einsetzende deutliche zytotoxische Effekte nachweisbar, die sich in einer Abnahme der vitalen Zellpopulation und signifikanten Zunahme des spätapoptotisch / nekrotischen Anteils der Chondrozyten, insbesondere beim Nachweis der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18, äußerte.

Für die Volumenregulation einer Zelle sind auswärts gerichtete Cl^- -Kanäle von entscheidender Bedeutung. Bei Chondrozyten, die unter dem Einfluss des Cl^- -Kanalblockers SITS kultiviert wurden, ließen sich ohne vorherige Apoptoseinduktion nekrotische Prozesse nachweisen. Es ist zu vermuten, dass es durch Blockade der volumenregulierenden Cl^- -Kanäle zu einem unkontrollierten Anschwellen der Chondrozyten kommt und dies schließlich zur Zellruptur führt.

K⁺-Kanalblockade mittels 4-AP führte bei humanen Chondrozyten zu einer sehr frühzeitigen Apoptoseinduktion. K⁺-Kanäle sind sowohl für die Regulation des Membranpotentials als auch für die Volumenregulation der Zelle von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird auch die Apoptoseinduktion durch 4-AP gesehen. Unbeantwortet bleibt die Frage, ob die durch 4-AP induzierte K⁺-Kanalblockade über eine Öffnung von nichtselektiven Kationenkanälen einen Ca²⁺-Einstrom bewirkt, der zur Aktivierung hydrolytischer Enzyme führt und diese eine Zerstörung des Zytoskeletts bewirken, oder ob die K⁺-Kanalblockade eine osmotische Schwellung der Chondrozyten bewirkt, welche letztlich eine Apoptose induziert.

Zum Ladungsausgleich der negativen Glucosaminglycane verfügen Chondrozyten über ungewöhnlich hohe extrazelluläre Na⁺-Konzentrationen. Dieses Ionengleichgewicht wird über epitheliale Na⁺-Kanäle vermittelt. In arthrotischem Knorpelgewebe werden diese Kanäle auf Grund vorangegangener mechanischer Beanspruchung und damit verbundener Veränderungen des Ionenmilieus vermindert exprimiert. Der Na⁺-Kanalblocker Lidocain bewirkte nur bei hohen Konzentrationen und nach längerer Inkubationszeit eine Apoptoseinduktion. Es bleibt jedoch unklar, ob die vergleichsweise geringe Toxizität von Lidocain auf der verminderten Kanalexpression beruht, oder ob der Funktionszustand der Chondrozyten durch Na⁺-Kanalblockade generell nur geringfügig beeinflusst wird.

Für die Dynamik eines biologischen Systems spielen neben den Fragen der Zellneubildung und des programmierten Zelltodes Regulationsvorgänge von Stoffwechsellleistungen eine entscheidende Rolle. Die Hyaluronsäure ist ein wesentlicher Baustein der extrazellulären Knorpelmatrix und wird von Chondrozyten synthetisiert und exprimiert. Die Bindung von Chondrozyten an extrazelluläre Hyaluronsäure wird wesentlich über zelleigene Oberflächenrezeptoren, die CD44-Rezeptoren, gesteuert. Diese sind an Zell-Zell-Interaktionen, Signaltransduktionsprozessen ins Zellinnere und anderen physiologischen Prozessen beteiligt, haben aber auch bei verschiedenen Tumorzelllinien wachstumsregulierende Eigenschaften. Im hyalinen Knorpelgewebe konnte nachgewiesen werden, dass die Zunahme der CD44-Expression mit der Degradation der Knorpelmatrix verbunden ist, aber gleichzeitig zum Verlust von proteoglycanreicher Matrix führt. Die Matrixdegradation kann jedoch durch Bindung von Hyaluronsäure an die CD44-Rezeptoren verhindert werden.

Die Lidocain-induzierte Na⁺-Kanalblockade und die durch 4-AP hervorgerufene K⁺-Kanalblockade an der Zellmembran humaner Chondrozyten bewirkte nach kurzen Inkubationszeiten eine Steigerung der CD44-Expression. Diese war nach 72-stündiger Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar. Bei längeren Inkubationszeiten zeigte sich bei

Chondrozyten, welche unter dem Einfluss von SITS oder Verapamil kultiviert wurden, eine signifikante Hemmung der CD44-Rezeptorexpression.

Diese durch Modulation der Ionenkanalaktivität ausgelösten Veränderungen der CD44-Expression bei humanen Chondrozyten lässt die Schlussfolgerung zu, dass CD44-vermittelte Prozesse über eine gezielte Steuerung der Ionenkanalaktivität reguliert werden können. Damit könnte also über eine Steuerung der Ionenkanäle die Degradation der Knorpelmatrix beeinflusst werden. Wir sehen in diesen Befunden eine Möglichkeit, neue therapeutische Ansätze der Arthrosebehandlung zu bearbeiten.

Neben der Expression von CD44-Rezeptoren wurde der Einfluss von Ionenkanalmodulatoren auf die Synthese von Kollagen Typ I und Typ II untersucht. Kollagene sind zusammen mit den Glucosaminglycanen der extrazellulären Knorpelmatrix, wie auch in allen anderen Bindegeweben, für die Stabilität des Gewebes verantwortlich. Kollagene wirken bei mechanischer Belastung vor allem Zugkräften entgegen, Glucosaminglycane widerstehen hauptsächlich Druckeinwirkungen. 95% der Kollagene der extrazellulären Knorpelmatrix sind Kollagen Typ II. Chondrozyten, welche aus dem Knorpelgewebe isoliert und in vitro kultiviert werden, verlieren diese Eigenschaft. Die Zellen dedifferenzieren und zeichnen sich durch eine sonst atypische Synthese von Kollagen Typ I aus. Die vorliegenden Befunde zur Regulation der Kollagenexpression durch Ionenkanalmodulation zeigen, dass unabhängig von der eingesetzten Testsubstanz, jede Ionenkanalblockade und die daraus resultierende Verschiebung des Membranpotentials, tendenziell zur Senkung der Kollagen Typ II-Expression führt, ohne dass es zu Veränderungen der Kollagen Typ I – Synthese kommt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass über die Aktivität verschiedener spezifischer Ionenkanäle an der Zellmembran humaner Chondrozyten unterschiedlichste feinstrukturelle und biochemische Prozesse reguliert werden. Die genaue Kenntnis dieser Regulationsvorgänge ist Voraussetzung für eine mögliche therapeutische Nutzung dieser Mechanismen. Die hier dargestellten Befunde sind als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu verstehen, die dazu beitragen, die Zusammenhänge dieser Steuerungs- und Regulationsvorgänge zu erkennen, und so die Erarbeitung neuer therapeutischer Optionen für die Arthrosebehandlung zu ermöglichen.

6 Literatur

1. Adam J. Einführung in die medizinische Biometrie. Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, 1992
2. Aguiar DJ, Knudson W, Knudson CB. Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp Cell Res* 252, 1999: 292-302
3. Aigner T, Finger F, Gebhard PM, Zien A, Zimmer R. Genexpressionsprofilierung adulter humaner Chondrozyten mittels der cDNA-Array-Technologie. *Z Rheumatol* 61, 2002: 260-262
4. Akeson WH, Bugbee W, Chu C, Giurea A. Differences in mesenchymal tissue repair. *Clin Orthop* 2001: 124-141
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waltson JD. Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waltson JD (Hrsg.): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995: 599-650
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waltson JD. Zellverbindungen, Zell/Zell-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waltson JD (Hrsg.): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995: 1121-1195
7. Amigorena S, Choquet D, Teillaud L, Korn H, Fridman, H. Ion channels and B cell mitogenesis. *Mol Immunol* 27, 1990: 1259-1268
8. Ares MP, Porn-Ares MI, Thyberg J, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Diczfalusy U, Kallin B, Bjorkhem I, Orrenius S, Nilsson J. Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res* 38, 1997: 2049-2061

9. Arner EC, Tortorella MD. Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheum* 38, 1995: 1304-1314
10. Arnold T, Deinlein E. Prinzip der DNS-Cytometrie zur Bestimmung des nucleären DNS-Gehaltes von Zellkernsuspensionen. *Zentralbl Hautkr* 150, 1985: 727-807
11. Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanisi C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res* 50, 2001: 19-23
12. Baer AE, Wang JY, Kraus VB, Setton LA. Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures. *J Orthop Res* 19, 2001: 2-10
13. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139, 1996: 122-127
14. Berkeley MB, Daussin S, Hernandez MC, Bayer BM. In vitro effects of cocaine, lidocaine and monoamine uptake inhibitors on lymphocyte proliferative responses. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 16, 1994: 165-178
15. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146, 1995: 75-85
16. Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N. Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *J Cell Sci* 112 (Pt 19), 1999: 3343-3352
17. Bruynzeel I, Koopman G, van der Raaij LMH, Pals T, Willemze R. CD44 antibody stimulates adhesion of peripheral blood t cells to keratinocytes through the leukocyte function- associated antigen. *J Invest Dermatol* 100, 1993: 424-428
18. Buckwalter J, Mow C, Hunziker E. Concepts of cartilage repair in osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM (Hrsg.): *Osteoarthritis*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto, 2001: 101-114

-
19. Bullough W. The epidermal chalone mechanismus. *Nat Cancer Inst Monogr* 38, 1973: 98-107
 20. Burger H, van Daele PL, Odding E, Valkenburg HA, Hofman A, Grobbee DE, Schutte HE, Birkenhager JC, Pols HA. Association of radiographically evident osteoarthritis with higher bone mineral density and increased bone loss with age. The Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 39, 1996: 81-86
 21. Chin LS, Park CC, Zitnay KM, Sinha M, DiPatri AJ, Jr., Perillan P, Simard JM. 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K⁺ channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res* 48, 1997: 122-127
 22. Chow G, Knudson CB, Homandberg G, Knudson W. Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators. *J Biol Chem* 270, 1995: 27734-27741
 23. Chow G, Nietfeld JJ, Knudson CB, Knudson W. Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum* 41, 1998: 1411-1419
 24. Cole AA, Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Huch K, Koepp H, Eger W, Aurich ME, Rolaufts B, Margulis A, Muehleman C, Valdellon A, Kuettner KE. Metabolic differences between knee and ankle. In: Hascall VC, Kuettner KE (Hrsg.): *The many faces of Osteoarthritis*. Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin, 2002: 27-29
 25. Cooper KD, Hammerberg C, Baadsgaard O, Elder JT, Chan LS, Sauder DN, Voorhees JJ, Fisher G. IL-1 activity is reduced in psoriatic skin. *J Immunol* 144, 1990: 4593-4603
 26. Deutsch C. K⁺ channels and mitogenesis. *Prog Clin Biol Res* 334, 1990: 251-271
 27. Dore S, Pelletier JP, DiBattista JA, Tardif G, Brazeau P, Martel-Pelletier J. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum* 37, 1994: 253-263

-
28. Dowthwaite GP, Edwards JC, Pitsillides AA. An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development. *J Histochem Cytochem* 46, 1998: 641-651
 29. Dubois JM, Rouzaire-Dubois B. Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 59, 1993: 1-21
 30. Eleno N, Botana L, Espinosa J. K-channel blocking drugs induce histamine release and ^{45}Ca uptake in isolated mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92, 1990: 162-167
 31. Endow SA, Glover DM. *Dynamics of Cell Division*. Oxford University Press, Oxford, New York; Tokyo, 1998,
 32. Eyre DR, Atley LM, Wu JJ. Collagen cross-links as markers of bone and cartilage degradation. In: Hascall VC, Kuettner KE (Hrsg.): *The many faces of Osteoarthritis*. Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin, 2002: 275-284
 33. Flechtenmacher J, Koyano Y, Hejna M, Schmid TM, Puhl W, Mollenhauer J. Haben Kalzium- und Zinkionen einen Einfluß auf die Matrixmolekülsynthese von Chondrozyten? *Z Orthop* 134, 1996: 283-289
 34. Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* 44, 2000: 61-76
 35. Fritsch P. *Dermatologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988: 3-37
 36. Funk JO, Kind P. Zellzykluskontrolle, genetische Stabilität und Krebs. *Hautarzt* 48, 1997: 157-165
 37. Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Anat Anz* 182, 2000: 303-310
 38. Gasparro FP. p53 in dermatology. *Arch Dermatol* 134, 1998: 1029-1032

-
39. Gerlach D. Untersuchungen zum Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäurefragmenten und Bewertung der UV-Protektion. Diplomarbeit, Math Nat Tech Fakultät Universität Halle, 1999
 40. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* 15, 1978: 801-811
 41. Gross G, Czichos S, Ju W, Häupl T, Sittinger M, Burmester GR, Gazit D, Hoffmann A. Signalkaskaden bei der Knorpel- und Knochenbildung. *Z Rheumatol* 59, 2001: 406-407
 42. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989: 6367-6371
 43. Harmon SC, Lutz D, Ducote J. Potassium channel openers stimulate DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures. *Pharmacol Rev* 6, 1993: 170-178
 44. Häupl T, Kaps Ch, Bramlage C, Ungethüm U, Gross G, Sittinger M, Burmester GR. Bone Morphogenetic Proteins: Regeneratoren und Protektoren für Gelenkknorpel? *Z Rheumatol* 59, 2000: 414-415
 45. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydekotte MB, Kuettner KE, Thonar JMA. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Science* 107, 1994: 17-27
 46. Hennings H, Michael D, Chengs C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 1980: 245-254
 47. Hilgermann T. Der Einfluß des Kaliumkanalblockers TEA auf die Melaninsynthese humaner Melanomzellen der Zelllinie IGR. Dissertation, Med. Fak. Universität Halle, 1996

-
48. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. 2. Aufl. Sinauer associates Inc., Sunderland (Massachusetts), 1992
 49. Hoffman S, Gopalakrishna R, Gundimeda U, Murata T, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. Verapamil inhibits proliferation, migration and protein kinase C activity in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 67, 1998: 45-52
 50. Hoyer J, Distler A, Haase W, Gogelein H. Ca²⁺ influx through stretch-activated cation channels activates maxi K⁺ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1994: 2367-2371
 51. Hutchison C, Glover DM. Cell cycle controll. In: Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, 1995
 52. Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res* 12, 1997: 1657-1663
 53. Jiang H, Knudson CB, Knudson W. Antisense inhibition of CD44 tailless splice variant in human articular chondrocytes promotes hyaluronan internalization. *Arthritis Rheum* 44, 2001: 2599-2610
 54. Jiang S, Chow SC, Nicotera P, Orrenius S. Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res* 212, 1994: 84-92
 55. Jones KT, Sharpe GR. Intracellular free calcium and growth changes in single human keratinocytes in response to vitamin D and five 20-epi-analogues. *Arch Dermatol Res* 286, 1994: 123-129
 56. Kameda K, Kondo T, Tanabe K, Zhao QL, Seto H. The role of intracellular Ca(2+) in apoptosis induced by hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 2001: 1369-1379
 57. Karvinen S, Kosma VM, Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours. *Br J Dermatol* 148, 2003: 86-94

-
58. Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsuaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol* 179, 1999: 142-148
 59. Kim HS, Park YB, Oh JH, Jeong J, Kim CJ, Lee SH. Expression of CD44 isoforms correlates with the metastatic potential of osteosarcoma. *Clin Orthop* 2002: 184-190
 60. Kim JA, Kang YS, Jung MW, Kang GH, Lee SH, Lee YS. Ca²⁺ influx mediates apoptosis induced by 4-aminopyridine, a K⁺ channel blocker, in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Pharmacology* 60, 2000: 74-81
 61. Kokubun S, Saigusa A, Tamura T. Blockade of Cl channels by organic and inorganic blockers in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 418, 1991: 204-213
 62. Krammer PH. Apoptose. *Dt Ärztebl* 97, 2000: B1481-B1488
 63. Kreis T, Vale R. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, 1999, 158-162
 64. Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, McDaniel SS, Zhang S, Rubin LJ, Yuan JX. Nitric oxide induces apoptosis by activating K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, 2002: H184-H193
 65. Krüger I. Entwicklung einer Trägerstruktur aus resorbierbaren Polymerfliesen und Hyaluronsäure zur in vitro Herstellung von Knorpeltransplantaten. Diplomarbeit, TU Berlin, 1999
 66. Kuettner KE, Aurich ME, Cole AA. Strukturelle und metabolische Unterschiede von Gelenkknorpeln. *Z Rheumatol* 59, 2000: 395-396
 67. Laube F. Cell surface expression of CD44: detection on tumor cells by immunoluminescence compared to fluorescence analysis. John Wiley & Sons, Chichester New York Weinheim Brisbane Singapore Toronto, 1999: 126-129
 68. Laube F. Co-localization of CD44 and urokinase-type plasminogen activator (uPA) on the surface of human melanoma cells. *Anticancer Res* 19, 1999: 5709-5710

-
69. Laube F. Co-localization of CD44 and urokinase-type plasminogen activator on the surface of human melanoma cells. *Anticancer Res* 20, 2000: 5045-5048
 70. Laube F, Gohring B, Sann H, Willhardt I. Cell surface antigens in renal tumour cells: detection by immunoluminescence and enzymatic analysis. *Br J Cancer* 85, 2001: 924-929
 71. Lee YS, Sayeed MM, Wurster RD. Inhibition of cell growth by K⁺ channel modulators is due to interference with agonist-induced Ca²⁺ release. *Cellular Signal* 5, 1993: 803-809
 72. Lepple-Wienhues A, Berweck S, Böhmig M, Leo CP, Meyling B, Garbe C, Wiederholt M. K⁺ Channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membrane Biol* 151, 1996: 149-157
 73. Lisignoli G, Grassi F, Zini N, Toneguzzi S, Piacentini A, Guidolin D, Bevilacqua C, Facchini A. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum* 44, 2001: 1800-1807
 74. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nuttall ME, Hung HH, Blake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 381, 2000: 205-212
 75. Long KJ, Walsh KB. A calcium-activated potassium channel in growth plate chondrocytes: regulation by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 1994: 776-781
 76. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop* 2001: S108-S115
 77. Lübke J, Kleihues P, Burg G. Das Tumorsuppressor-Gen p53 und seine Bedeutung für die Dermatologie. *Hautarzt* 45, 1994: 741-745
 78. Lyyra T, Arokoski JP, Oksala N, Vihko A, Hyttinen M, Jurvelin JS, Kiviranta I. Experimental validation of arthroscopic cartilage stiffness measurement using enzymatically degraded cartilage samples. *Phys Med Biol* 44, 1999: 525-535

-
79. MacFarlane SN, Sontheimer H. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30, 2000: 39-48
 80. Martina M, Mozrzymas JW, Vittur F. Membrane stretch activates a potassium channel in pig articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1329, 1997: 205-210
 81. Mauro MT, Isseroff RR, Lasarow R, Pappone AP. Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J Membrane Biol* 132, 1993: 201-209
 82. McAlinden A, Fukui N, Sandell LJ. Type IIA procollagen NH₂-propeptide functions as an antagonist of bone morphogenetic proteins. In: Hascall VC, Kuettner KE (Hrsg.): *The many faces of Osteoarthritis*. Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin, 2002: 5-16
 83. Metz J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. In: Erggelet C, Steinwachs M (Hrsg.): *Gelenkknorpeldefekte*. Steinkoff, Darmstadt, 2001: 3-14
 84. Meulenbelt I, Bijkerk C, de Wildt SC, Miedema HS, Valkenburg HA, Breedveld FC, Pols HA, Te Koppele JM, Sloos VF, Hofman A, Slagboom PE, van Duijn CM. Investigation of the association of the CRTM and CRTL1 genes with radiographically evident osteoarthritis in subjects from the Rotterdam study. *Arthritis Rheum* 40, 1997: 1760-1765
 85. Mobasheri A. Correlation between [Na⁺], [glycosaminoglycan] and Na⁺/K⁺ pump density in the extracellular matrix of bovine articular cartilage. *Physiol Res* 47, 1998: 47-52
 86. Mobasheri A, Mobasheri R, Francis MJ, Trujillo E, Alvarez dIR, Martin-Vasallo P. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca²⁺] and pH. *Histol Histopathol* 13, 1998: 893-910
 87. Morhenn VB. Keratinocyte proliferation in wound healing and skin diseases. *Immunol Today* 9, 1988: 104-107
 88. Mow C, Wang CB. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage. *Clin Orthop* 367 (Suppl), 1999: 204-223

-
89. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. 7. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1997,
 90. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 1997: 355-365
 91. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 18, 1997: 769-776
 92. Neidhardt M, Gay RE, Gay S. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43, 2000: 1719-1728
 93. Neidhardt M, Gay RE, Gay S. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43, 2000: 1719-1728
 94. Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23, 1998: 173-180
 95. Nilius B. Signaltransduction in vascular endothelium: The role of intracellular calcium and ion channels. *Verh K Acad Geneesk Belg* 60, 1998: 215-250
 96. Nilius B. Chloride channels go cell cycling. *J Physiol* 532, 2001: 581
 97. Nilius B, Böhm T, Wohlrab W. Properties of a potassium-selective ion channel in human melanoma cells. *Pflügers Arch* 417, 1990: 269-277
 98. Nilius B, Droogmans G. A role for potassium channels in cell proliferation? *News Physiol Sci* 16, 1994: 1-12
 99. Nilius B, Eggermont J, Droogmans G. Chloride channels in endothelium: The role of mechanostimulation and changes in cell volume. In: Lelkes PF (Hrsg.): *Mechanical forces and the endothelium*. Harvard Academic, London, 1999: 33-54

-
100. Nilius B, Wohlrab W. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol* 445, 1992: 537-548
 101. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W. Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 43, 2000: 1315-1326
 102. Noulin JF, Brochiero E, Coady MJ, Laprade R, Lapointe JY. Molecular identity and regulation of renal potassium channels. *Jpn J Physiol* 51, 2001: 631-647
 103. Okada Y, Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130, 2001: 377-383
 104. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532, 2001: 3-16
 105. Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1993: 398-405
 106. Pap T, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Gelenkdestruktion bei der Arthritis. *Z Rheumatol* 59, 2000: 418-419
 107. Pappas CA, Ullrich N, Sontheimer H. Reduction of glial proliferation by K⁺ channel blockers is mediated by changes in pH. *Neuroreport* 6, 1994: 193-196
 108. Partridge M, Chantry D, Turner M, Feldmann M. Production of interleukin-1 and interleukin-6 by human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *J Invest Dermatol* 96, 1991: 771-776
 109. Pecina M, Jelic M, Martinovic S, Haspl M, Vukicevic S. Articular cartilage repair: the role of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop* 26, 2002: 131-136
 110. Pfander D, Körtje D, Weseloh G, Swoboda B. Zellproliferation im humanen arthrotischen Gelenkknorpel. *Z Orthop* 139, 2001: 375-381

-
111. Pieri C, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Falasca M, Krasznai Z, Gaspar R, Matyus L, Damjanovich S. A sodium channel opener inhibits stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol* 29, 1992: 517-524
 112. Poole AR, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM (Hrsg.): *Osteoarthritis*. W.B. Saunders Company, Philadelphia London New York St. Louis Sydney Toronto, 2001: 29-47
 113. Preston A. Matrix metalloproteinases (MMPs). *Extracellular Matrix Proteases & Proteins Technical Guide 2*, 2002: 1-19
 114. Pullig O, Pfander D, Swoboda B. Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression. *Orthopäde* 30, 2001: 825-833
 115. Ragan PM, Badger AM, Cook M, Chin VI, Gowen M, Grodzinsky AJ, Lark MW. Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. *J Orthop Res* 17, 1999: 836-842
 116. Ragan PM, Chin VI, Hung HH, Masuda K, Thonar EJ, Arner EC, Grodzinsky AJ, Sandy JD. Chondrocyte extracellular matrix synthesis and turnover are influenced by static compression in a new alginate disk culture system. *Arch Biochem Biophys* 383, 2000: 256-264
 117. Raley-Susman KM, Kass IS, Cottrell JE, Newman RB, Chambers G, Wang J. Sodium influx blockade and hypoxic damage to CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 86, 2001: 2715-2726
 118. Recklies AD, White C, Melching L, Roughley PJ. Differential regulation and expression of hyaluronan synthases in human articular chondrocytes, synovial cells and osteosarcoma cells. *Biochem J* 354, 2001: 17-24
 119. Riemschneider S. Zur Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei UV-vermittelten Veränderungen an Keratinozyten unter besonderer Berücksichtigung von Wachstum, Apoptose und DNS-Modifikationen. Dissertation, Math Nat Tech Fakultät Universität Halle, 2001

-
120. Riemschneider S, Galgon T, Podhaisky HP, Wohlrab W. Flowzytometrische Methoden zur Bewertung von Apoptose. *BIOforum* 2001: 46-48
 121. Rouzaire-Dubois B, Dubois JM. K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol* 510 (Pt 1), 1998: 93-102
 122. Rybalchenko V, Prevarskaya N, Van Coppenolle F, Legrand G, Lemonnier L, Le B, X, Skryma R. Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating. *Mol Pharmacol* 59, 2001: 1376-1387
 123. Sachs L. *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin, 1992
 124. Sakai H, Nakamura F, Kuno M. Synergetic activation of outwardly rectifying Cl⁻ currents by hypotonic stress and external Ca²⁺ in murine osteoclasts. *J Physiol* 515 (Pt 1), 1999: 157-168
 125. Salter DM, Godolphin JL, Gourlay MS, Lawson MF, Hughes DE, Dunne E. Analysis of human articular chondrocyte CD44 isoform expression and function in health and disease. *J Pathol* 179, 1996: 396-402
 126. Sato MI, Koshino T, Takagi T. CD44 expression on chondrocytes in knees of DBA/1 mice with type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 17, 1999: 185-190
 127. Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1990
 128. Schneiderman R, Rosenberg N, Hiss J, Lee P, Liu F, Hintz RL, Maroudas A. Concentration and size distribution of insulin-like growth factor-I in human normal and osteoarthritic synovial fluid and cartilage. *Arch Biochem Biophys* 324, 1995: 173-188
 129. Scholz R. *Der Einfluß von Ionenkanalmodulatoren auf das Membranpotential und die Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen*. Diplomarbeit, Math Nat Tech Fakultät Universität Halle, 2002,

-
130. Schumacher PA, Sakellaropoulos G, Phipps DJ, Schlichter LC. Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes. *J Membr Biol* 145, 1995: 217-232
 131. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79, 1997: 1452-1463
 132. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 82, 2000: 151-160
 133. Shapiro HM. Cell membran potential analysis. *Methods Cell Biol* 41, 1994: 121-133
 134. Sharma L. Epidemiology of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM (Hrsg.): *Osteoarthritis*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London New York St. Louis Sydney Toronto, 2001: 3-27
 135. Shen MR, Droogmans G, Eggermont J, Voets T, Ellory JC, Nilius B. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol* 529 Pt 2, 2000: 385-394
 136. Smitherman KA, Sontheimer H. Inhibition of glial Na⁺ and K⁺ currents by tamoxifen. *J Membr Biol* 181, 2001: 125-135
 137. Speake T, Douglas IJ, Brown PD. The role of calcium in the volume regulation of rat lacrimal acinar cells. *J Membr Biol* 164, 1998: 283-291
 138. Studzinski GP. *Cell growth and apoptosis*. Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, 1995
 139. Sugimoto T, Yoshino M, Nagao M, Ishii S, Yabu H. Voltage-gated ionic channels in cultured rabbit articular chondrocytes. *Comp Biochem Physiol* 115C, 1996: 223-232

-
140. Takagi T, Okamoto R, Suzuki K, Hayashi T, Sato M, Sato M, Kurosaka N, Koshino T. Up-regulation of CD44 in rheumatoid chondrocytes. *Scand J Rheumatol* 30, 2001: 110-113
 141. Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 27, 2000: 1713-1720
 142. Treppo S, Koepp H, Quan EC, Cole AA, Kuettner KE, Grodzinsky AJ. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res* 18, 2000: 739-748
 143. Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ, Keefe DL. Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, 2002: C588-C594
 144. Trujillo E, Alvarez dIR, Mobasher A, Avila J, Gonzalez T, Martin-Vasallo P. Sodium transport systems in human chondrocytes. I. Morphological and functional expression of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase alpha and beta subunit isoforms in healthy and arthritic chondrocytes. *Histol Histopathol* 14, 1999: 1011-1022
 145. Trujillo E, Alvarez dIR, Mobasher A, Gonzalez T, Canessa CM, Martin-Vasallo P. Sodium transport systems in human chondrocytes. II. Expression of ENaC, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/H⁺ exchangers in healthy and arthritic chondrocytes. *Histol Histopathol* 14, 1999: 1023-1031
 146. Tsuga K, Tohse N, Yoshino M, Sugimoto T, Yamashita T, Ishii S, Yabu H. Chloride conductance determining membrane potential of rabbit articular chondrocytes. *J Membr Biol* 185, 2002: 75-81
 147. Ullrich N, Sontheimer H. Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. *Am J Physiol* 270, 1996: C1511-C1521
 148. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103 (Pt 2), 1992: 293-298

-
149. Vocke M. Untersuchungen zur Zytotoxizität von Ionenkanalmodulatoren an humanen Chondrozyten. Diplomarbeit, Math Nat Tech Fakultät Universität Halle, 2002,
 150. Voets T, Droogmans G, Nilius B. Modulation of voltage-dependent properties of a swelling-activated Cl⁻ current. *J Gen Physiol* 110, 1997: 313-325
 151. Voets T, Szucs G, Droogmans G, Nilius B. Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflügers Arch* 431, 1995: 132-134
 152. Voets T, Wei L, De Smet P, Van Driessche W, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. Downregulation of volume-activated Cl⁻ currents during muscle differentiation. *Am J Physiol* 272, 1997: C667-C674
 153. von der Mark K. Chondrozytendifferenzierungsprozesse im Gelenkknorpel. *Z Rheumatol* 59, 2000: 391-394
 154. Wang L, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G. Control of extracellular matrix homeostasis of normal cartilage by a TGFβ autocrine pathway. Validation of flow cytometry as a tool to study chondrocyte metabolism in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 2002: 188-198
 155. Webb GR, Westacott CI, Elson CJ. Chondrocyte tumor necrosis factor receptors and focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 1997: 427-437
 156. Weber E. Grundriß der biologischen Statistik. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980
 157. Whyte MK, Hardwick SJ, Meagher LC, Savill JS, Haslett C. Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 92, 1993: 446-455
 158. Wilson GA. Cell Adhesion Molecules. R&D Systems, Minneapolis Abingdon Wiesbaden, 1996
 159. Woessner JF. Metalloproteinases and osteoarthritis. In: Hascall VC, Kuettner KE (Hrsg.): The many faces of Osteoarthritis. Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin, 2002: 241-246

-
160. Wohlrab D. Der Einfluß elektrophysiologischer Membraneigenschaften auf die Proliferation humaner Keratinozyten. Tectum Verlag, Marburg, 1998, 1-89
161. Wohlrab D, Hein W. The proliferation of human chondrocytes is regulated by ionic channels. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 1999: S7
162. Wohlrab D, Hein W. Der Einfluß von Ionenkanalmodulatoren auf das Membranpotential humaner Chondrozyten. *Orthopäde* 29, 2000: 80-84
163. Wohlrab D, Lebek S, Krüger T, Reichel H. Influence of ion channels on the proliferation of human chondrocytes. *Biorheology* 39, 2002: 55-61
164. Wohlrab D, Markwardt F. The influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca²⁺ -concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12, 1999: 257-265
165. Wohlrab D, Markwardt F, Hein W. Der Einfluß von Ionenkanalmodulatoren auf humane Chondrozyten. In: Erggelet C, Steinwachs M (Hrsg.): *Gelenkknorpeldefekte*. Steinkoff, Darmstadt, 2001: 59-68
166. Wohlrab D, Vocke M, Klapperstück T, Hein W. Effects of potassium and anion channel blockers on the cellular response of human chondrocytes. *J Orthop Sci* 2004: im Druck
167. Wondergem R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Conner TD, Houser M, Ecay TW, Ferslew KE. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J Physiol* 532, 2001: 661-672
168. Yao X, Kwan HY. Activity of voltage-gated K⁺ channels is associated with cell proliferation and Ca²⁺ influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci* 65, 1999: 55-62
169. Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 13, 2001: 405-411
170. Zhu L, Chun J. *Apoptosis - detection and assay methods*. Eaton Publishing, 1998,

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein)

Thesen der H a b i l i t a t i o n

Regulation der Proliferation , Apoptose und Funktion humaner Chondrozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. David Wohlrab
geboren am 11. März 1971 in Halle/S.

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

7 Thesen

1. Der Gelenkknorpel überzieht die artikulierenden Knochenenden als wenige Millimeter dicke Schicht. Die Chondrozyten nehmen mit 1 Vol.-% bis 10 Vol.-% nur einen sehr geringen Teil des Knorpelgewebes ein. Hauptbestandteil ist mit 70-80% Volumenanteil Wasser. Dieses wird durch die vom Chondrozyten synthetisierte extrazelluläre Matrix gebunden. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagenen, insbesondere Kollagen Typ II und Glucosaminglycanen.
2. Der hyaline Gelenkknorpel wirkt auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften stoßdämpfend – elastisch, ermöglicht eine optimale Kraftübertragung und ist zusammen mit der Gelenkflüssigkeit für ein reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen verantwortlich. Er hält enormen Druckschwankungen stand.
3. Für die Arthroseentstehung sind neben verschiedenen mechanischen Faktoren in jüngster Vergangenheit mehr und mehr feinstrukturelle Kenntnisse über biochemische Abläufe beschrieben worden, welche das Gleichgewicht zwischen Degradation des Knorpelgewebes und der Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile durch die Chondrozyten destabilisieren.
4. Die Regulationsvorgänge bei der Steuerung zellulärer Prozesse und spezifischer StoffwechsellLeistungen von Chondrozyten sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei der Entstehung und der Progredienz der Arthrose sind als sehr komplex erkannt, können jedoch auf Grund der noch unvollständigen Erkenntnisse derzeit nicht umfassend beurteilt werden. Bisher wenig berücksichtigt sind hierbei elektrophysiologische Abläufe und Veränderungen an der Zellmembran humaner Chondrozyten.
5. Die Chondrozyten wurden aus humanem arthrotisch verändertem Kniegelenkknorpel enzymatisch isoliert und in einer Monolayer-Kultur kultiviert. Verwendung fand ausschließlich das Knorpelgewebe der Femurkondylen und bei erheblicher Achsfehlstellung des jeweils geringer belasteten Areals.

6. Die Bestimmung des Membranpotentials und dessen Veränderung unter dem Einfluss der verschiedenen Testsubstanzen erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Oxonol VI.
7. Die Messung der DNA-Verteilung humaner Chondrozytenpopulationen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid und der Durchflusszytometrie.
8. Als Maß für die Proliferationsrate wurde der ^3H -Thymidinmarkierungsindex bestimmt.
9. Der Nachweis der Apoptose humaner Chondrozyten erfolgte durch vergleichende Bestimmung der Translokation des Phosphatidylserins, des Mitochondrienmembranspezifischen Proteins Apo2.7 sowie der Caspaseaktivität am Zytokeratin 18.
10. Die Untersuchungen der Beeinflussung zellulärer Leistungen humaner Chondrozyten erfolgten durch Messung der CD44-Rezeptorexpression sowie der Bestimmung der Synthese von Kollagen Typ I und Typ II.
11. Das Membranpotential humaner Chondrozyten ist von der Aktivität der Ionenkanäle abhängig. Die Kaliumkanalblockade durch 4-Aminopyridin (4-AP), der Einsatz des Kalziumantagonisten Verapamil und Cl^- - und Anionenkanalhemmung mittels SITS (4-Acetamido-4-iso-thiocyanato-2,2-stilbendisulfonsäure) führten zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Na^+ -Kanalblockade durch Lidocain verursachte eine Depolarisation der Chondrozytenzellmembran.
12. Humane Chondrozyten wiesen eine sehr geringe proliferative Tendenz auf. 95% der untersuchten Zellen befanden sich in der G0/G1-Phase, lediglich 1% in der S-Phase und nur 4% in der G2/M-Phase des Zellzyklus.
13. Die Proliferationsrate der humanen Chondrozyten nimmt in Abhängigkeit von der Kulturdauer kontinuierlich zu und erreicht ein Maximum am 12. Kulturtag. Anschließend sank die Proliferationsrate bis zum 21. Kulturtag. Eine temporäre Proliferationssteigerung wurde unter dem Einfluss von Lidocain, 4AP und SITS beobachtet. Der Kalziumantagonist Verapamil induzierte keine Proliferationsänderung bei humanen Chondrozyten.

-
14. Das Apoptoseverhalten humaner Chondrozyten wird durch die Ionenkanalaktivität an der Zellmembran reguliert.
 15. Die Expression des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 wird in Abhängigkeit von der Inkubationszeit durch die Testsubstanzen reguliert. Kurzzeitige Inkubation von Lidocain oder 4-Aminopyridin führten zu einer Steigerung der CD44-Expression. Unter dem Einfluss von Verapamil und SITS zeigte sich nach längerer Inkubationszeit eine Hemmung der CD44-Expression.
 16. Bei humanen Chondrozyten führt die Ionenkanalmodulation durch Lidocain, Verapamil, 4-Aminopyridin oder SITS nicht zur Veränderung der Kollagen Typ I – Expression. Die Synthese des Kollagens Typ II wird durch alle diese Substanzen gehemmt. Diese Hemmung war unter dem Einfluss des Na⁺-Kanalblockers Lidocain und bei Hemmung der Cl⁻ - Kanäle mittels SITS am stärksten ausgeprägt.
 17. Über die Aktivität verschiedener spezifischer Ionenkanäle an der Zellmembran humaner Chondrozyten werden unterschiedlichste feinstrukturelle und biochemische Prozesse reguliert. Für eine mögliche therapeutische Nutzung dieser Mechanismen, ist die genaue Kenntnis dieser Regulationsvorgänge Voraussetzung.
 18. Die hier dargestellten Befunde sind als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu verstehen, die dazu beitragen, die Zusammenhänge dieser Steuerungs- und Regulationsvorgänge aufzudecken, und so der Erarbeitung therapeutischer Optionen für die Arthrosebehandlung dienen.

Curriculum vitae

Name: Dr.med. David Wohlrab
Mörikestraße 13; 06118 Halle (Saale)
Facharzt für Orthopädie

Geburtstag: 11.03.1971
Geburtsort: Halle/Saale
Eltern: Mutter: Renate Wohlrab (geb. Jost)
Vater: Prof.Dr.rer.nat. Wolfgang A.Wohlrab

Geschwister: Dr.med. Lukas Wohlrab
Priv.-Doz. Dr.med. Johannes Wohlrab

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Christiane Wohlrab (geb. Faßhauer)

Kinder: Antonia geb.31.12.2000

Ausbildung: 1977 - 1987
Polytechnische Oberschule
1987 - 1989
Erweiterte Oberschule Adolf Reichwein
1989 - 1990
Grundwehrdienst (Transportpolizei)
1990 – 1995
Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
1995 –1996
Praktisches Jahr an der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in den Fächern:
- Orthopädie
- Chirurgie (Traumatologie)
- Innere Medizin (Intensivstation)
1996
Mitglied im Graduiertenkolleg „Transport von Wirkstoffen in
biologischen Systemen“ ” (GRK 134/1-96)
Okt. 1996 – Dez. 1996
Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Julius-Bernstein-Institut für
Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof.Dr.med.habil. G. Isenberg)

Dez. 1996 – März 1998

Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof.Dr.med.habil. W. Fritz)

April 1998 – Mai 2003

Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof.Dr.med.habil. W. Hein)

seit 20. Mai 2003

Facharzt für Orthopädie an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Okt. 1997

Promotion zum Doktor der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Thema: „Einfluss elektrophysiologischer Membraneigenschaften auf die Proliferation humaner Keratinozyten“ (magna cum laude)

seit Okt. 2003

Mitarbeit im Bibliotheksausschuß des Fakultätsrates der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dez. 1998

Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz für den Anwendungsbereich: Notfalldiagnostik im Rahmen der Erstversorgung und Notfallbehandlung

Dez. 1999

Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz für den Anwendungsbereich: Röntgendiagnostik des gesamten Skelettsystems

Mai.2002

Erwerb der Zusatzbezeichnung Chirotherapie

seit Jan. 2001

Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC)

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE HABILITATIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Habilitationsversuche gab, weder mit dieser Arbeit noch mit einer anderen, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität.

Halle, im Dezember 2003

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Halle, im Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit entstand an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von

Herrn Prof.Dr.med.habil. W. Hein,

dem ich für seine unermüdliche und großzügige Unterstützung und Beratung sehr herzlich danke. Die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft bei der Planung und Durchführung der experimentellen Studien sowie die akademische und freundschaftliche Betreuung haben die Erstellung dieser Arbeit erheblich erleichtert.

In besonderem Maße bin ich *Frau Angela Rosemeier, Frau Ursula Schramm* und *Frau Karin Hölsken* zu Dank verpflichtet, die durch ihre freundliche Hilfe ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen und mich durch ihre persönliche Einsatzbereitschaft sehr unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt *Frau Dipl.Pharm. Michaela Vocke* für die Unterstützung bei der Durchführung der Apoptoseuntersuchungen.

Herrn *Dr.rer.nat. Thomas Klapperstück* danke ich für die Beratung und Hilfestellung bei den flowzytometrischen Experimenten und für die Unterstützung bei der Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen *Patienten*, die ihr Einverständnis zur Verwendung des Knorpelmaterials gaben und damit den Grundstein für die Durchführung der Untersuchungen legten.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch den *ärztlichen Mitarbeitern der Orthopädischen Universitätsklinik Halle* sagen, die mich durch ihre Arbeit und zahlreiche Diskussionen sehr unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt meiner *Ehefrau Christiane*, meiner *Tochter Antonia*, meinen *Eltern und Geschwistern* für ihre Geduld, ihren Zuspruch und ihre liebevolle Unterstützung.