

# Interaktion zwischen humanen Chondrozyten und extrazellulärer Matrix in vitro

## Ein Beitrag zur autologen Chondrozytentransplantation

### Hintergrund und Fragestellung

Gelenkknorpelverletzungen stellen einen irreversiblen Knorpelverlust dar, weil der Gelenkknorpel nur eine geringe Heilungsfähigkeit besitzt. Als Folge entsteht oft eine Arthrose. Weltweit sind Millionen von Menschen von Gelenkknorpeldefekten betroffen. Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) hat als neuere Therapiemethode in den letzten Jahren bei kleineren nichtarthrotischen Knorpeldefekten Erfolg gezeigt [2, 3, 4, 20]. Die Vermehrung differenzierter autologer Chondrozyten in vitro für eine ACT ist jedoch begrenzt, weil eine Vermehrung nur in der Monolayerkultur gelingt und zur Dedifferenzierung der Chondrozyten führt [22]. Dedifferenzierte Chondrozyten bilden keine belastungsfähige extrazelluläre Matrix (d. h. Knorpel) mehr [1]. Die Anwendung irreversibel dedifferenzierter Zellen zur ACT resultiert in einem funktionell minderwertigen Knorpel, der nicht in der Lage ist den mechanischen Beanspruchungen, denen hyaliner Gelenkknorpel unterliegt, gerecht zu werden.

Die Knorpelmatrix enthält u. a. knorpelspezifische Proteoglykane, Typ-II-Kollagen, Fibronectin und andere kleinere Kollagene vom Typ IX und XI [6, 9, 15]. Diese Matrix hat eine regulatorische Wirkung auf die Prägung der Differenzierungsrichtung, die Proliferation, die Funk-

tion und die Erhaltung des Chondrozytenphänotyps [13, 14]. Zentrale Informationsvermittler zwischen innerem und äußerem Milieu der Chondrozyten sind die Integrine [7, 25, 27, 30]. Integrine sind heterodimere Adhäsionsmoleküle, die aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette aufgebaut sind [11, 12, 21]. Integrine der  $\beta 1$ -Gruppe wurden im Knorpelgewebe sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen. Die Bindung von  $\beta 1$ -Integrinen an Matrixkomponenten wie Typ-II-Kollagen führt zur Zusammenlagerung von fokalen Adhäsionskomplexen [29], welche verschiedene zytoskelettale Proteine, Verbindungsproteine und Kinasen enthalten. Eine Hemmung der  $\beta 1$ -Integrine verhindert die Differenzierung von Chondrozytenvorläuferzellen und damit die Chondrogenese [24].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Typ-II-Kollagen in vitro einen integrinvermittelten Einfluss auf die Stabilität, auf die Richtung der Differenzierung und auf den Erhalt des Chondrozytenphänotyps hat. Gleichzeitig spielt die Synthese und die Interaktion von Schlüssel-signalproteinen des MAPK-Signalübertragungsweges hier eine besondere Rolle. Diese neuen Kenntnisse könnten die In-vitro-Vermehrung autologer Chondrozyten verbessern und dem Einsatz dieser Technik bei größeren oder sogar arthrotischen Knorpeldefekten mehr Aussicht geben.

### Material und Methoden

#### Materialien

Polyklonaler Antikörper gegen Typ-II-Kollagen, die monoklonalen Antikörper Anti- $\beta 1$ -Integrin und der monoklonale und polyklonale Sekundärantikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase), wurden von der Fa. Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA) bezogen. Anti-Phosphotyrosine und anti-Shc stammen von der Fa. Transduction (Wiesbaden); goldkonjugierter sekundärer Antikörper von der Fa. Amersham (Braunschweig). Das Zellkulturmedium (Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium mit 10% FCS) wurde bei der Fa. Seromed erworben (München). LR-White und Thermanoxplättchen wurden bei der Fa. Plano (Marburg), HMDS (Hexamethyldisilazan), Typ-II-Kollagen, Fluoromount und Trypsin bei der Fa. Sigma (München), Pronase und Kollagenase bei der Fa. Boehringer (Mannheim) gekauft.

#### Methoden

#### Isolierung von humanen Chondrozyten und Monolayerkultur aus Alginatkügelchen

Ausgangsmaterial bildeten primäre humane Chondrozyten, isoliert aus 10 Knorpelproben von operativen Eingriffen bei

Oberschenkelhalsfrakturen. Der hyaline Gelenkknorpel wurde bei medialen Oberschenkelhalsfrakturen aus nicht-arthritischem Gelenk (mittleres Alter) gewonnen. Zuerst wurden die Knorpelstücke gespült, für 2 h in 1,0% Pronase und weitere 4 h in 0,2% Kollagenase geschüttelt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die primären humanen Chondrozyten wurden unmittelbar nach ihrer Isolierung in Alginatkultur gebracht. Dieses Alginatkultursystem dient als Reservoir, das jederzeit zur Gewinnung von Chondrozyten genutzt werden kann, schon nach wenigen Tagen wandern ausreichend Chondrozyten aus dem Alginat aus (▣ Abb. 1) [23].

### Alginatkultur

Eine genaue Beschreibung der Kultivation von Chondrozyten in Alginat wurde in der Arbeit von Shakibaei u. De Souza [26] veröffentlicht. Die Chondrozyten wurden in Alginat gerührt und langsam bei Raumtemperatur (RT) in eine Lösung mit 100 mM CaCl<sub>2</sub> getropft. Die Alginat-tröpfchen polymerisieren in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> nach ca. 10 min.

### Monolayerkultur

Die nach ein paar Tagen aus dem Alginat ausgewanderten Chondrozyten wiesen runde bis ovale Phänotypen auf und sie produzierten das knorpelspezifische Matrixprotein Typ-II-Kollagen [22, 23]. Außerdem überleben fibroblastenähnliche Zellen im Alginat nicht (s. oben) [26]. Man kann die Alginatkultur also als Filterstation betrachten, die eine reine Chondrozytenkultur liefert. Die ausgewanderten Chondrozyten begannen zu adhären und bildeten so einen Monolayer. Die Chondrozyten wurden auf mit oder ohne Typ-II-Kollagen (0,5–2,0 mg/ml in 0,25% Essigsäure) beschichteten Thermanoxplättchen zum Zwecke der Rasterelektronenmikroskopie und Glasplättchen zum Zwecke der Lichtmikroskopie kultiviert.

### Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden mit 1% Paraformaldehyd fixiert, über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4°C und danach 1 h mit dem Sekundärantikörper bei RT inkubi-

M. Shakibaei · C. Csaki · M. Rahmzadeh · R. Putz

## Interaktion zwischen humanen Chondrozyten und extrazellulärer Matrix in vitro. Ein Beitrag zur autologen Chondrozytentransplantation

### Zusammenfassung

**Hintergrund.** Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) hat als Therapiemethode bei kleineren Knorpeldefekten Erfolge gezeigt. Die Vermehrung der Chondrozyten für ACT gelingt nur in vitro und diese führt zur Dedifferenzierung der Zellen. Ziel dieser Arbeit war, die Züchtung von Chondrozyten zu optimieren und eine Dedifferenzierung der Zellen zu verhindern.

**Material und Methode.** Die humanen Chondrozyten wurden auf mit und ohne Typ-II-Kollagen beschichteten Oberflächen kultiviert. Die Zellen wurden morphologisch und mittels „Immunoblotting“ untersucht.

**Ergebnisse.** Auf Typ-II-Kollagen bleibt der chondrogene Phänotyp bis zum 20. Tag stabil und es werden mehr aktivierte intrazelluläre Proteine sowie das Adaptorprotein Shc (src

homology collagen) nachgewiesen. Behandlung mit  $\beta$ 1-Integrin-Antikörpern führte zu einer deutlichen Abnahme (82%) der Zell-Adhäsion. Typ-II-Kollagen und Chondrozyteninteraktion führte zur Aktivierung der Integrine, die über das Shc-Protein den Ras-MAPK-Signalübertragungsweg aktivieren, welcher den chondrogenen Phänotyp stabilisiert.

**Schlussfolgerung.** Diese Kenntnisse könnten langfristig die In-vitro-Vermehrung autologer Chondrozyten verbessern und dem Einsatz dieser Technik bei größeren oder sogar arthrotischen Knorpeldefekten mehr Aussicht geben.

### Schlüsselwörter

Chondrozyten · Phänotyp · Typ-II-Kollagen · Integrin · Elektronenmikroskopie

## Interaction between human chondrocytes and extracellular matrix in vitro. A contribution to autologous chondrocyte transplantation

### Abstract

**Background.** Autologous chondrocyte transplantation (ACT) has had reasonable success for repairing small articular cartilage defects. A limiting factor for ACT is, however, the in vitro cultivation of chondrocytes because it leads to dedifferentiation. Therefore, the goal of this work was to optimize the monolayer culture of chondrocytes in vitro.

**Material and method.** Human articular chondrocytes were plated on either collagen type II or untreated surfaces. The cells were evaluated morphologically and with immunoblotting.

**Results.** On collagen type II surfaces, a stable chondrogenic phenotype, expression of  $\beta$ 1-integrin, and a significant activation of phosphorylated intracellular proteins and the

adaptor protein Shc could be observed up to day 20 in culture. Treatment with  $\beta$ 1 integrin antibody led to a loss of cell adhesion (82%). The results indicate that on collagen type II,  $\beta$ 1-integrin receptors are activated. Through the activation of Shc, these stimulate the Ras-MAPK pathway, which stabilizes the chondrogenic phenotype.

**Conclusion.** Our results provide a practical and low-cost solution for improved long-term chondrocyte cultivation, thus providing a new perspective for using ACT on larger or arthrotic cartilage defects.

### Keywords

Chondrocyte · Phenotype · Collagen type II · Integrin · Electron microscopy

biert. Die Glasplättchen wurden mit Fluoromount eingedeckt und mit einem Zeiss Axiovert 100 ausgewertet.

### Rasterelektronenmikroskopie

Die Chondrozyten wurden zuerst für 5 min mit 1% Glutaraldehyd fixiert, danach 5 min mit Osmium behandelt, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, für 5 min in HMDS überführt und dann luftgetrocknet. Die Präparate wurden in einer Kathodenzerstäubungsanlage goldmetallisiert, und in einem Rasterelektronenmikroskop von Cambridge Stereoscan (250 MK2) bei 20 KV untersucht.

### Immunelektronenmikroskopie

Bei der Immunelektronenmikroskopie wurden die Proben in 3% Formaldehyd fixiert, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in LR-White eingebettet. Dickschnitte wurden mit Toluidine-Blau für lichtmikroskopische Untersuchungen gefärbt. Die Ultradünnschnitte der Kulturen wurden mit spezifischen Primärantikörpern markiert. Nach mehreren Spülschritten wurden dann mit Goldpartikeln konjugierte Sekundärantikörper dazugegeben, welche an die Primärantikörper banden und diese sichtbar machten.

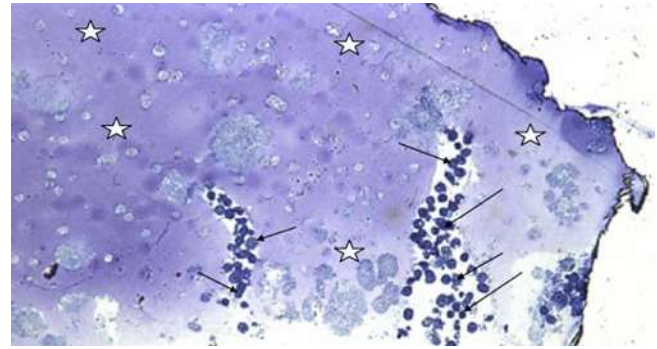
### Adhäsionsassay in vitro

Die Chondrozyten wurden isoliert und dann mit  $\beta_1$ -Integrin-Antikörper und mit normalem Serum (NS) behandelt, anschließend wurden die beiden Gruppen auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen und auf Plastik in Monolayerkultur kultiviert. Die Zellzahl wurde durch die Zählung der adhärenz Zellen von 10 mikroskopischen Feldern bestimmt.

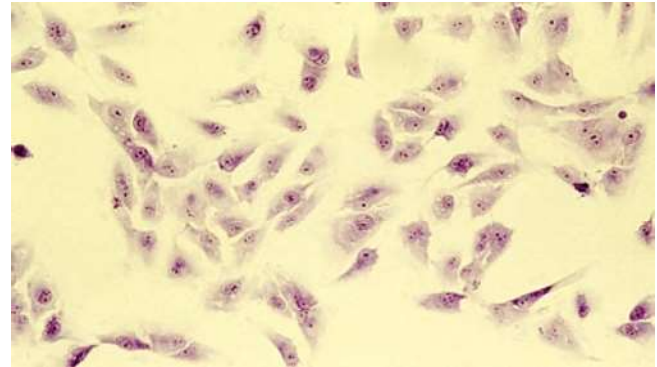
### Western-Blot-Analyse

Eine detaillierte Beschreibung der angewandten Western-Blot-Technik findet sich bei Shakibaei et al. [28, 30]. Die Proben wurden in Lysispuffer bei 4°C homogenisiert. Die Proben mit gleichem Gesamtproteingehalt wurden in 75 %igen Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend mittels eines Transblot-Elektrophoreseapparats auf Zellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper und

**Abb. 1** ▶ Lichtmikroskopisches Bild emigrierender Zellen aus dem Alginat: Nach Haftung der Alginatkügelchen (Sternchen) am Boden der Kulturgefäße wandern Zellen (Pfeile) aus und bilden eine Monolayerkultur (Vergr. 40:1)



**Abb. 2** ▶ Lichtmikroskopisches Bild einer Monolayerkultur nach dem Auswandern aus dem Alginat: kleine runde, bipolare oder sternförmige Zellen. Es finden sich alle Übergänge zwischen diesem Zelltyp und den großen runden Zellen (Vergr. 160:1)



anschließend für 1 h bei RT mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die spezifische Antikörperbindung wurde mittels Nitroblautetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indo-yl-phosphat als Substrat nachgewiesen.

## Ergebnisse

### Bedeutung von Typ-II-Kollagen für den Chondrozytenphänotyp in Monolayerkultur

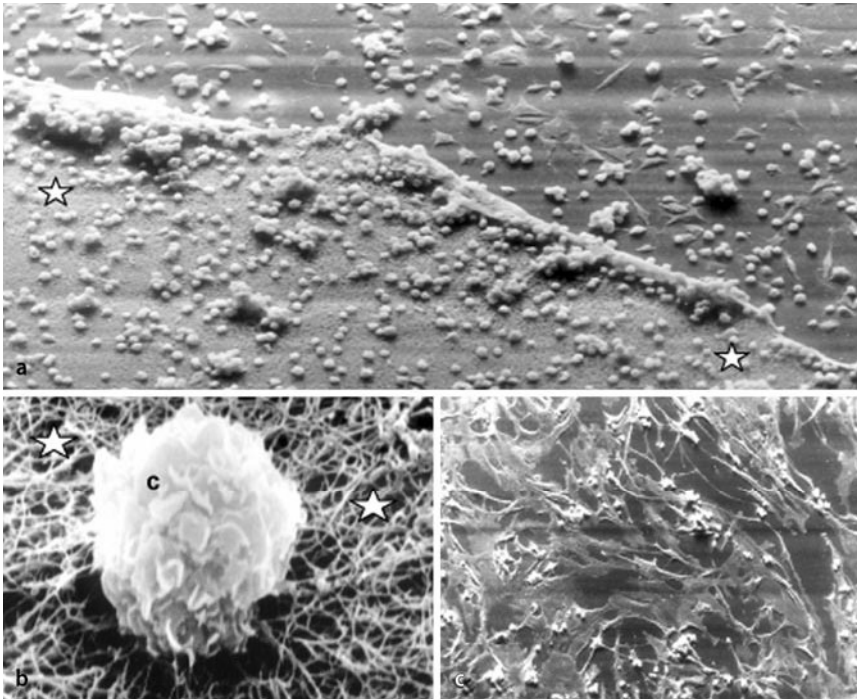
Die primären humanen Chondrozyten wurden unmittelbar nach ihrer Isolierung in Alginatkultur gebracht. Nach wenigen Tagen wandern meist ausreichend Chondrozyten aus dem Alginat (s. **Abb. 1**) [23] aus. Für die Versuche werden diese Chondrozyten dann in Monolayer kultiviert (**Abb. 2**).

Nach einer Kultivationsdauer von 24 h auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen ließ sich die Haftung der Chondrozyten in Form einer Monolayerkultur nachweisen (**Abb. 3a**). Die Chondrozyten behielten ihren runden Phänotyp bis zum 20. Tag nach Beginn der Kultivation auf Typ-II-Kollagen (**Abb. 3b**). In den ersten Tagen bis zum 20. Tag nahm die Zahl und die Dichte der

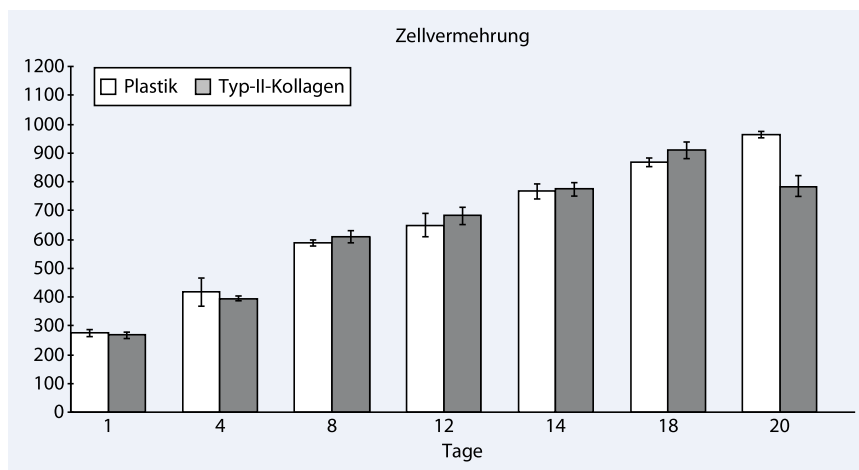
Zellen zu (**Abb. 4**). Die Zellen lösten sich von diesem Zeitpunkt an mehr und mehr von der Unterlage ab. In der Monolayerkultur ohne Beschichtung mit Typ-II-Kollagen wurde vom Beginn der Kultivation an eine Mischkultur von flachen Fibroblasten und runden Chondrozyten beobachtet (**Abb. 3a**, **Abb. 4**). Nach einer Kultivationsdauer von 3–5 Tagen kam es hier zu einer zunehmenden Vermehrung von fibroblastenähnlichen Zellen (**Abb. 3c**).

Bei den immunmorphologischen Untersuchungen konnte die Identität des Knorpelphänotyps mit Hilfe von Typ-II-Kollagen nachgewiesen werden (**Abb. 5a**, **b**). Die Anwesenheit von Typ-II-Kollagen konnte vom 2. Tag (A) bis zum 20. Tag (B) verfolgt werden. Die  $\beta_1$ -Integrine kamen verstreut auf den runden bis ovalen Chondrozyten vom 2. Tag (**Abb. 5c**) bis zum 20. Tag (**Abb. 5d**) vor. Mittels immunmorphologischer Untersuchungen mit sekundären goldkonjugierten Antikörpern gegen  $\beta_1$ -Integrine konnten sowohl im Kontrollversuch (**Abb. 6a**) wie auch auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen (**Abb. 6b**)  $\beta_1$ -Integrine auf der Oberfläche der Chondrozyten nachgewiesen werden. Die Expression der  $\beta_1$ -Integrine auf der Oberfläche der Chondrozyten, die auf





**Abb. 3** ▲ Rasterelektronenmikroskopisches Bild isolierter, humaner Chondrozyten in Monolayerkultur: Eine Hälfte der Thermanoxplättchen ist mit Typ-II-Kollagen (*Sternchen*), die andere Hälfte ist nicht beschichtet. Die Zellen auf der mit Typ-II-Kollagen beschichteten Hälfte sind rund. Die Zellen auf der nichtbeschichteten Unterlage sind eine Mischkultur aus runden Chondrozyten und flachen Zellen (**a**, Vergr. 350:1). Die Chondrozyten (**c**) auf der mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlage halten während der gesamten Kultivationsdauer ihren Phänotyp stabil (**b**, Vergr. 6300:1). Nach einer Kultivationsdauer von 5 Tagen wurde auf der unbeschichteten Unterlage eine zunehmende Überwucherung durch fibroblastenähnliche Zellen beobachtet (**c**, Vergr. 350:1)



**Abb. 4** ▲ Proliferation der Chondrozyten auf Plastik und auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen in Monolayerkultur: Die Chondrozyten wurden isoliert und dann auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen und auf Plastik in Monolayerkultur kultiviert. Die Zellzahl repräsentiert hier die Zählung der adhären Zellen von 10 mikroskopischen Feldern

mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen kultiviert wurden, waren jedoch im Vergleich mit dem Kontrollversuch deutlicher (**Abb. 6**).

### β1-Integrine vermitteln die Interaktion von Chondrozyten mit Typ-II-Kollagen

Um zu prüfen, ob die β1-Integrin-Gruppe eine Zellmatrixinteraktion bereits in vitro vermittelt, wurden die Chondrozyten

unmittelbar nach ihrer Isolierung mit β1-Integrin-Antikörpern und mit normalem Serum behandelt und die beiden Gruppen im Anschluss daran auf Plastik und auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen kultiviert. Es wurde beobachtet, dass die Adhäsion zwischen Chondrozyten und Typ-II-Kollagen bis zu 82% durch β1-Integrin-Antikörper gehemmt werden konnte. Zwischen Chondrozyten und Plastik konnte eine ähnliche Adhäsionshemmung beobachtet werden (**Abb. 7**).

### Die Interaktion der Chondrozyten mit Typ-II-Kollagen induziert die Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Signalproteine

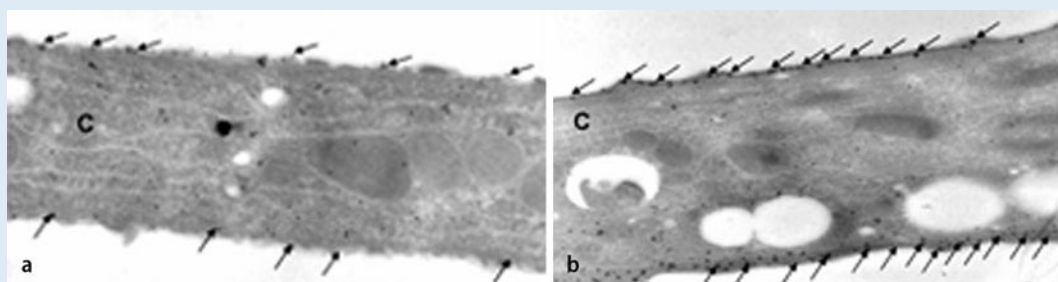
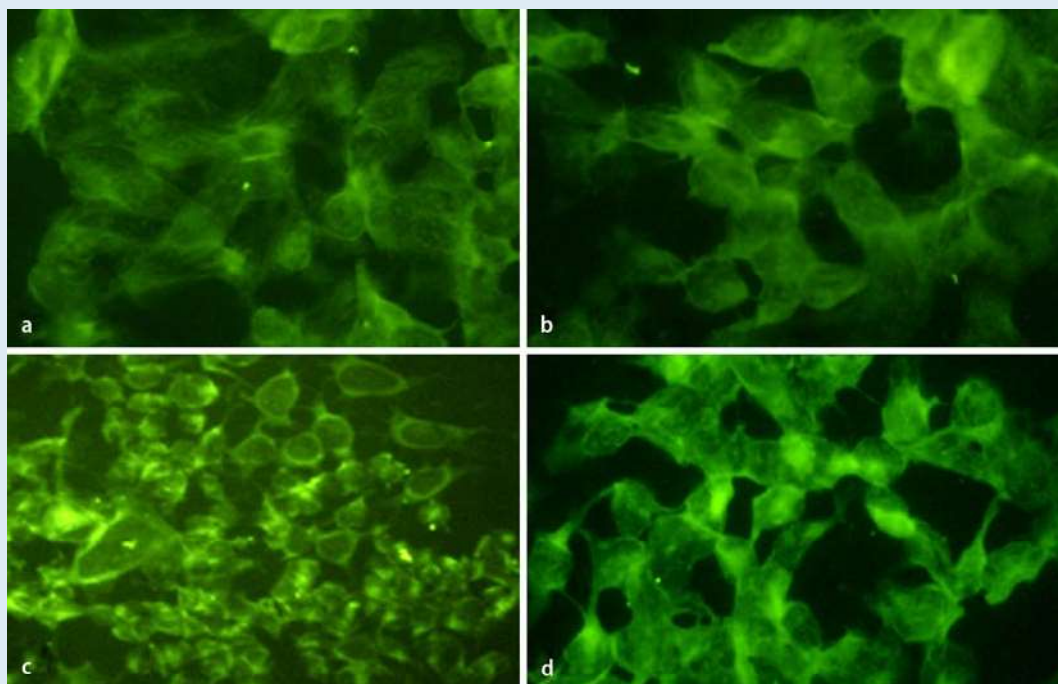
Die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine ist eines der ersten Ereignisse bei der Reaktion der Chondrozyten auf eine spezifische Integrinstimulation. Dieser Effekt konnte durch Immunoblotting mit Anti-Phosphotyrosin nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass als Folge der Zelladhäsion auf Typ-II-Kollagen eine Reihe von intrazellulären Proteinen an Tyrosinresten vom 1. Tag bis zum 20. Tag nach Beginn der Kultivierung in der Kultur phosphoryliert werden (**Abb. 8**). Im Kontrollversuch wurde nicht das typische Muster an phosphorylierten Signalproteinen beobachtet (**Abb. 8**).

### Integrin-Typ-II-Kollagen-Interaktion führt zu einer Aktivierung von Shc

Bei der Charakterisierung der intrazellulären Proteine in humanen Chondrozyten konnten zusätzlich Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 40–70 kDa gefunden werden (**Abb. 8**). Es handelte sich hier um das Adaptorprotein Shc. Das Shc-Protein ist ein lösliches Adaptorprotein, dass eine SH2- (Src homology 2-)Phosphotyrosin-bindende Domäne besitzt. Shc besitzt 3 Isoformen mit 46, 52 und 66 kDa. Shc ist in der Lage, verschiedene Tyrosinkinasen mit dem Ras-Signalübertragungsweg zu verbinden. Im Kontrollversuch fehlte bei den Chondrozyten, die auf unbeschichteten Unterlagen angezüchtet wurden, eine Aktivierung aller Shc-Isomere (**Abb. 9**).



**Abb. 5** ▶ Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung (Vergr. 360:1) von Typ-II-Kollagen und  $\beta$ 1-Integrin auf der Oberfläche der Chondrozyten in der Monolayerkultur: Die Produktion von Typ-II-Kollagen wurde vom 2. Tag (a) bis zum 20. Tag (b) in Form eines Hofes um die Chondrozyten verfolgt. Die Expression von  $\beta$ 1-Integrin konnte während der gesamten Kultivationsdauer vom 2. Tag (c) bis zum 20. Tag (d) auf den runden bzw. ovalen Chondrozyten beobachtet werden



**Abb. 6** ▲ Immuntransmissionselektronenmikroskopische Darstellung (Vergr. 45.000:1) von  $\beta$ 1-Integrin auf der Oberfläche der Chondrozyten in der Monolayerkultur: Immunmarkierung der Chondrozyten gegen  $\beta$ 1-Integrin in der Kontrolle (a) und auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen (b). Eine dichte Markierung (Pfeile) kann hier auf der Oberfläche der Chondrozyten, die auf Typ-II-Kollagen kultiviert waren, beobachtet werden

## Diskussion

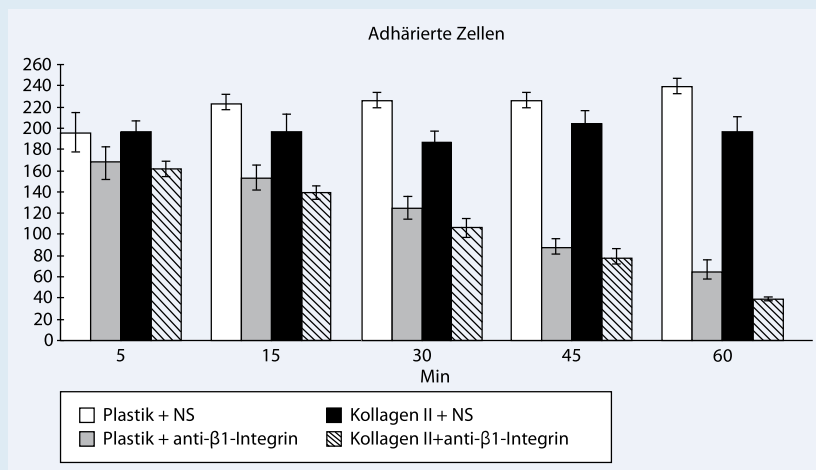
Die ACT ist ein modernes Verfahren zur Therapie von isolierten Knorpeldefekten an Gelenkflächen. In den Defektzonen können nach der Transplantation hyaline Knorpelregenerate nachgewiesen werden. Die durch Peterson et al. [19] erstmals 1984 durchgeführte ACT beim Kaninchen stellt inzwischen eine etablierte und anerkannte Methode in der Behandlung von isolierten artikulären Knorpeldefekten dar. Nach Feststellung eines Knorpeldefekts wird das Knorpelgewebe arthroskopisch aus unbelasteten Gelenkarealen gewonnen, enzymatisch isoliert und die aus dem Gewebe gewonnen Knorpelzellen in vitro vermehrt [18]. In vitro kommt es da-

bei zum Phänomen der *Dedifferenzierung der Zellen*, d. h. die Chondrozyten kehren in ein Teilungsstadium zurück und bilden keine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix (EZM) mehr. Dabei verlieren sie den Kontakt mit der umgebenden Matrix, bilden Fortsätze aus, produzieren Typ-I-Kollagen, flachen ab und werden fibroblastenähnlich.

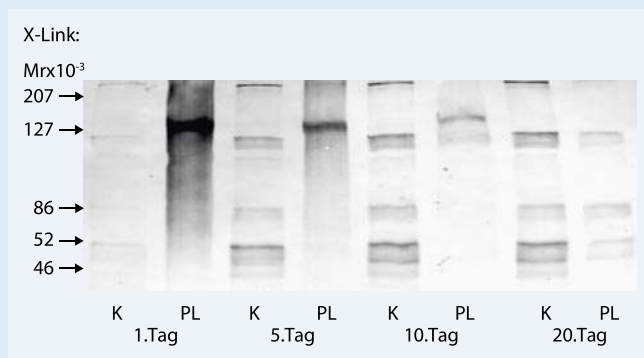
Eine Kontamination mit Fibroblasten und ihre Überwucherung [5, 17], Reifung und Alterung der Chondrozyten mit Bildung fibroblastenähnlicher Zellen [32] und eine Auflösung der Zell-Matrix-Verbindung [10, 16] sind als mögliche Ursachen für die Dedifferenzierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur in vitro diskutiert worden. Diese sog. „dedif-

ferenzierten“ Zellen werden in der ACT dann als Suspension in den Defekt eingefüllt und dieser mit einem Periostlappen (bioaktiver Kammer) abgedeckt, mit dem Ziel, in vivo wieder hyalinähnliches Knorpelgewebe zu bilden. Diese Methode hat bisher jedoch nur bei kleinen, traumatischen Defekten gute Ergebnisse gezeigt [3, 4, 20].

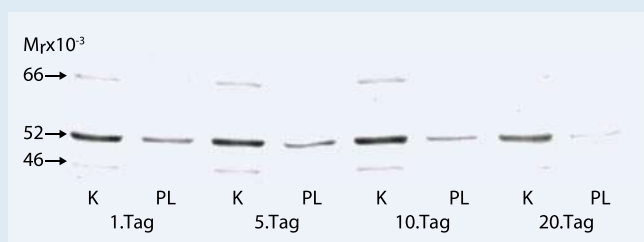
Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob exogene Matrixkomponenten eine Monolayerchondrozytenkultur für längere Zeit in differenziertem Zustand stabilisieren können. Dadurch könnte die Möglichkeit entstehen, den differenzierten Phänotyp von autologen Chondrozyten für die ACT zu nutzen. Derzeit ist ihre Anwendung auf die



**Abb. 7** ▲ Adhäsionsassay der Chondrozyten auf Plastik und auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen in An- und in Abwesenheit von Anti-β1-Integrin in Monolayerkultur: Die Chondrozyten wurden isoliert und dann mit β1-Integrin-Antikörper und mit normalem Serum (NS) behandelt, anschließend wurden die beiden Gruppen auf Plastik und auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen kultiviert



**Abb. 8** ▲ Western-Blot-Analyse – Monolayerkultur – Expression von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in den Chondrozyten: Die Expression von Tyrosin-Phosphorylierten Proteinen vom 1. Tag bis zum 20. Tag in der Kultur in den Chondrozyten, die auf beschichteten (K) und auf nichtbeschichteten Unterlagen (PL) kultiviert wurden. Das Molekulargewicht wird auf der linken Seite gezeigt



**Abb. 9** ▲ Western-Blot-Analyse – Monolayerkultur – Expression des Shc-Proteins in den Chondrozyten: Expression des Shc-Proteins (mit 3 Domänen) vom 1. Tag bis zum 20. Tag in der Kultur in den Chondrozyten, die auf beschichteten (K) und auf nichtbeschichteten Unterlagen (PL) kultiviert wurden. Das Molekulargewicht wird auf der linken Seite gezeigt

Behandlung kleinerer traumatisch entstandener Knorpeldefekte begrenzt. Dies könnte die Technik der ACT soweit verbessern, dass auch größere und im Frühstadium der Osteoarthritis entstandene Knorpeldefekte behandelbar werden.

Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die Chondrozyten bei Kultivierung auf mit Typ-II-Kollagen beschichteten Unterlagen 20 Tage ohne eine Veränderung ihrer Morphologie und ihrer spezifischen Syntheseprodukte überleben können. Die Chondrozyten produzieren Typ-II-Kollagen und exprimieren ihre typischen Oberflächenrezeptoren. Ohne Beschichtung mit Typ-II-Kollagen sind bereits am 3. Tag viele Zellen zu fibroblastenähnlichen Zellen umgewandelt. Nach längerer Kultivierung im Monolayer kommt es allerdings zur irreversiblen Dedifferenzierung. Die Chondrozyten haben ihr chondrogenes Potential verloren und können nach Überführung in die Alginate- oder Massenkultur nicht mehr überleben und somit nicht für ACT angewendet werden [22, 23].

Durch Typ-II-Kollagen-Kontakt wird also eine Dedifferenzierung ab dem 3. Tag verhindert. Die Stabilität des Chondrozytenphänotyps ist offenbar abhängig von dem Kontakt mit der knorpelspezifischen extrazellulären Matrix. Diese Matrix hat deshalb eine regulatorische Wirkung auf die Prägung der Differenzierungsrichtung, die Funktion und den Erhalt des Chondrozytenphänotyps. Diese wichtigen Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und den Chondrozyten können das Syntheseverhalten der Chondrozyten kontrollieren [7, 8, 13] und werden über spezifische Rezeptoren (Integrine) vermittelt. Im Kontrollversuch, d. h. bei einer Kultivierung der Chondrozyten ohne Beschichtung mit Typ-II-Kollagen, kommt es nach einer Kultivationsdauer von 5 Tagen zu einer Überwucherung mit fibroblastenähnlichen Zellen. Diese Zellen produzieren Typ-I-Kollagen und exprimieren andere Integrine auf der Oberfläche [25].

Es ist bekannt, dass der Zell-Matrix-Interaktion im Knorpelgewebe eine besondere Bedeutung zukommt. Bei Verlust der Zell-Matrix-Verbindung, z. B. im alternden oder pathologisch veränderten Knorpel, dedifferenzieren die Chondro-

zyten und wandeln sich zu fibroblasten-ähnlichen Zellen um. Diese Zellen ändern gleichzeitig auch ihr Syntheseprogramm und ihre Oberflächenrezeptoren [31].

Die Behandlung der Chondrozyten mit  $\beta$ 1-Integrin-Antikörpern führte zu einer deutlichen Abnahme der Chondrozytenadhäsion. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass  $\beta$ 1-Integrine wichtige Rezeptoren der Chondrozyten-Typ-II-Kollagen-Wechselwirkung sind. Die Integrin-Typ-II-Kollagen-Interaktion bei Chondrozyten induziert die Tyrosinphosphorylierung von einer Reihe von Signalproteinen, die an den fokalen Kontaktstellen der Zelle liegen und an der Organisation der Zytoskelettproteine beteiligt sind. Diese Signalproteine assoziieren später mit dem Adaptorprotein Shc. Das Shc-Protein assoziiert mit weiteren Adaptorproteinen Grb2 und Erk1 und 2. Es ist bekannt, dass der Shc-Grb2-Komplex dann den Ras-MAPK-Signalübertragungsweg stimuliert. Das Adaptorprotein Shc verbindet sich physikalisch mit Integrinen [28]. Eine Hemmung des Ras-MAPK-Signalübertragungsweges bei den Chondrozyten führt dann zur Apoptose der Zellen in vitro [29]. Die extrazelluläre Matrix hat also diverse Effekte auf das zelluläre Verhalten der Zellen und aktiviert via Integrinen die intrazellulären Signalübertragungswege.

## Fazit für die Praxis

**Diese Befunde sind von großer praktischer Bedeutung, da die Möglichkeiten v. a. der Langzeitkultivierung von Chondrozyten in vitro immer noch sehr begrenzt sind. Mit diesen Arbeiten könnte eine Optimierung der Kultivationsbedingungen erreicht werden. Darauf basierend lässt sich die chirurgische Knorpeltransplantation verbessern und genügend Material zur Verfügung stellen.**

## Korrespondenzadresse

### Prof. Dr. M. Shakibaei

Forschungsgruppe Muskuloskelettales System,  
Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Pettenkoferstraße 11, 80336 München  
mehdi.shakibaei@med.uni-muenchen.de

**Danksagung.** Der besondere Dank der Autoren gilt der technischen Unterstützung von Fr. Karoline Fischer.

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

- Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215–224
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895
- Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E et al. (2003) Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 85(Suppl 3): 109–115
- Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B et al. (2001) Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 391(Suppl): 337–348
- Bryan J (1968) Studies on clonal cartilage strains. I. Effect of contaminant non-cartilage cells. *Exp Cell Res* 52: 319–326
- Burton-Wurster N, Horn VJ, Lust G (1988) Immunohistochemical localization of fibronectin and chondronectin in canine articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 36: 581–588
- Durr J, Goodman S, Potocnik A et al. (1993) Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res* 207: 235–244
- Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D (1993) Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 205: 276–285
- Gerstenfeld LC, Landis WJ (1991) Gene expression and extracellular matrix ultrastructure of a mineralizing chondrocyte cell culture system. *J Cell Biol* 112: 501–513
- Grundmann K, Zimmermann B, Barrach HJ, Merker HJ (1980) Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies. *Virchows Arch* 389: 167–187
- Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549–554
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25
- Kosher RA, Church RL (1975) Stimulation of in vitro somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature* 258: 327–330
- Kosher RA, Lash JW, Minor RR (1973) Environmental enhancement of in vitro chondrogenesis. IV. Stimulation of somite chondrogenesis by exogenous chondromucoprotein. *Dev Biol* 35: 210–220
- Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L et al. (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol* 108: 191–197
- Merker HJ, Gunther T, Kruger U (1978) Effect of 4-methylumbelliferyl-beta-D-xylopyranoside on the morphology of embryonic cartilage in limb bud cultures. *Teratology* 18: 291–310
- Norby DP, Malesud CJ, Sokoloff L (1977) Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture. *Arthritis Rheum* 20: 709–716
- Oakes BW (2004) Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust* 180(Suppl 5): 35–38
- Peterson L, Menche D, Grande D (1984) Chondrocyte transplantation – an experimental model in the rabbit. *Transactions from the 30th Annual Orthopedic Research Society. Trans Orthop Res Soc* 9: 218
- Peterson L, Minas T, Brittberg M et al. (2000) Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374: 212–234
- Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87: 1–5
- Schulze-Tanzil G, Souza P de, Villegas Castrejon H et al. (2002) Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 308: 371–379
- Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Souza P de et al. (2004) Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 448–458
- Shakibaei M (1998) Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 240: 95–106
- Shakibaei M (1995) Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol* 10: 339–349
- Shakibaei M, Souza P de (1997) Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 21: 75–86
- Shakibaei M, Souza P de, Merker HJ (1997) Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int* 21: 115–125
- Shakibaei M, John T, Souza P de et al. (1999) Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 342: 615–623
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Souza P de et al. (2001) Inhibition of mitogen-activated protein kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 276: 13289–13294
- Shakibaei M, Seifarth C, John T et al. (2006) Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: Molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol* 72: 1382–1395
- Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ (1995) Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 43: 1061–1069
- Sokoloff L (1976) Articular chondrocytes in culture: matrix production and hormonal effects. *Arthritis Rheum* 19(Suppl 3): 426–429