

**Expressionsanalyse
der Zellzyklusregulatorproteine
der Zyklin-, CDK-, CDKI- und Rb-Familie
in humanen Chondrocyten *in-vitro*
in Abhängigkeit von
Proliferation und Differenzierung**

Dissertation

**der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

vorgelegt von

Joachim Reichl

aus Sindelfingen

2000

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.00

Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: PD Dr. M. Knipper
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann

Youthing

It's like the process of aging.

Just a process.

Your hair starts to grow wilder,
your skin gets smoother,
your appetites increase.

Suddenly, you sing in the shower and in the rain;
you discover a plant you've never seen before and you munch it.

What's that tiny star on your left temple?

Maybe a bird scratched it with tender claws to prod you into flying.

And then, that dialogue with the moon that keeps you awake,

and then, that dream of death

becoming more and more remote

- or is it the other way around?

Nina Cassian

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel 1: Einleitung	1
Kapitel 2: Material und Methoden	7
2.1 Material	8
2.2 Methoden	9
2.2.1 Histologie	9
2.2.1.1 Safranin O	9
2.2.1.2 Alzian Blau	10
2.2.1.3 Hämatoxilin-Eosin	10
2.2.1.4 Trichrom-Mallory	10
2.2.2 Dissoziation von Gewebe für die Zellkultur	11
2.2.3 Zellkultur	11
2.2.3.1 Monolayer-Kultur	11
2.2.3.2 Proliferationskontrolle mittels BrdU	11
2.2.3.3 Vitalfärbung	12
2.2.4 Immunhistochemie	12
2.2.5 Western-Blot	14
2.2.6 Ribonuclease-Protection-Assay	15

Kapitel 3: Ergebnisse	17
3.1 Identifizierung und Charakterisierung von humanem Knorpel- gewebe und dissoziierten Zellen	18
3.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchung von histologischen Knorpelgewebspräparaten	18
3.1.2 Immunhistologische Untersuchung auf knorpel- und bindegewebspezifische Marker	20
3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von kultivierten Chondrocyten	20
3.1.4 Immunhistologische Untersuchung der kultivierten Chondrocyten auf knorpelspezifische Marker	22
3.2 Analyse des Proliferationsverhaltens kultivierter humaner Chondrocyten	24
3.2.1 Veränderung der Proliferationsraten mit zunehmender Passagenzahl	24
3.2.2 Veränderung der Proliferationsraten nach Reduktion der Serummenge	27
3.3 Immunhistochemische Identifizierung von Zellzyklusregulatoren in humanem Knorpelgewebe	29
3.4 Identifizierung von Zellzyklusregulatoren in humanen Chondrocyten in verschiedenen Kulturpassagen und Kultur- bedingungen	37
3.4.1 Immunhistochemie	37
3.4.2 Western-Blot	48
3.5 Vergleichende quantitative Untersuchung der Zellzyklusregu- lator-Expressionsprofile	51
3.5.1 Ribonuclease-Protection-Assay	51

Kapitel 4: Diskussion	59
4.1 Änderung des Zellhabitus und des Differenzierungsgrades von humanen Chondrocyten in-vitro in Abhängigkeit von der Zahl durchlaufener Zellteilungen	60
4.2 Änderung des Proliferationsverhaltens humaner Chondrocyten in-vitro in Abhängigkeit von der Anzahl durchlaufener Zellteilungen und Anwesenheit von Serummitogenen	62
4.3 Änderung der Proteinexpression von Zellzyklusregulatoren in humanen Chondrocyten in-vitro in Abhängigkeit von der Anzahl durchlaufener Zellteilungen und Anwesenheit von Serummitogenen	66
Kapitel 5: Zusammenfassung	73
Kapitel 6: Literatur	75

Kapitel 1:

EINLEITUNG

Die Gewebe- und Organregeneration ist ein neu entstehender Forschungsbereich, der Möglichkeiten zur Nutzung des körpereigenen Regenerationspotentials untersucht. Auf dieser Basis sollen Erkrankungen, die vom Verlust einzelner Zellen bis hin zum Versagen ganzer Organe reichen, behandelbar werden [Langer et al., 1995].

Als Basisdisziplin der angewandten Regenerationsmedizin versucht die regenerationsbiologische Forschung somit die Grundlagen für eine körpereigene, also nicht auf Fremdgewebe angewiesene, Heilung von Organdefekten zu schaffen.

Im Bereich des sogenannten Tissue-Engineering [Langer & Vacanti, 1993] wird vor allem die Verbindung künstlicher, dreidimensionaler Matrixstrukturen zu komplexen, aus unterschiedlichsten Zelltypen bestehenden Konstrukten untersucht [Griffith et al., 1997]. Dabei liegt ein besonders großes Augenmerk auf dem Zusammenspiel der künstlichen und körpereigenen Komponenten [Hubbel, 1995], der Suche nach standardisierten Kulturbedingungen zur *ex-vivo* Expansion isolierter Zellen, aber auch auf der Untersuchung geeigneter Kulturmethoden, die ein möglichst *in-vivo* ähnliches, dreidimensionales Wachstum der Zellen zulassen [Freed & Vunjak-Novakovic, 1997].

Das Tissue-Engineering hat sich in den letzten Jahren besonders auf dem Bereich des *in-vitro* geschaffenen künstlichen Knorpels fokussiert. Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben des menschlichen Körpers. Zerstörung des Knorpelgewebes - auch nur oberflächliche - führt meist zu einem Verlust wichtiger Funktionen z.B. im Bereich des Fortbewegungsapparates. So leben derzeit in den USA etwa 10 Mio. Einwohner mit Implantaten, wobei jährlich weitere 140.000 Hüftprothesen eingesetzt werden. In Deutschland werden pro Jahr ca. 20.000 Knieprothesen eingesetzt und mehr als 100.000 relevante Knorpelschäden an Gelenken aktenkundig [Minuth et al., 1996]. Aber auch in der Kopf-Hals-Chirurgie spielt der Verlust von Knorpel vor allem nach Tumorresektionen eine große Rolle. Möglichkeiten zur körpereigenen Regeneration bestehen, wie sich schon aufgrund der embryonalen Entwicklung des Knorpelgewebes vermuten läßt, nicht.

So werden während der embryonalen Entwicklung aus mesenchymalen Vorläuferzellen unter Abrundung und Einzug der protoplasmatischen Fortsätze nach mehrfachen Teilungen Chondroblasten gebildet, die nach und nach mit der Synthese der die Zellen umgebenden Grundsubstanz beginnen. Bedingt durch die Ausschüttung der Grundsubstanz rücken die Chondroblasten immer weiter auseinander und differenzieren sich schließlich zu den eigentlichen Knorpelzellen - den Chondrocyten. Die Differenzierung des Knorpels findet also von innen nach außen statt. Vor der letztendlichen Ausdifferenzierung des Knorpels kann es noch zu einzelnen Teilungen der Chondrocyten kommen, die dem Wachstum des Knorpels von innen her dienen. Man spricht dabei von interstitiellem Knorpelwachstum, das jedoch beim Menschen auf die embryonale Entwicklung des Knorpels beschränkt bleibt [Junqueira & Carneiro, 1996].

Das oberflächlich den Knorpel umgebende Mesenchym differenziert während der Entwicklung nicht zu Chondrocyten, sondern gestaltet sich zum Perichondrium mit Fibroblasten oder präsumptiven chondrogenen Zellen um, welches zeitlebens dem appositionellen Wachstum dient. Mit Ausnahme der Gelenkknorpel umgibt das Perichondrium alle hyalinen und elastischen Knorpeloberflächen. Die Fibroblasten des Perichondriums bilden sich im Verlauf dieser Größenzunahme des Knorpels von außen her zu Chondroblasten um, die wiederum mit der Synthese von Grundsubstanz dem eigentlichen Wachstum Vorschub leisten [ibid.].

Vom Perichondrium wandern noch bei jungen Kindern Zellen in beschädigte Bereiche des Knorpels ein, solange diese nicht zu groß sind, und bilden dort neuen Knorpel. Andernfalls kommt es zu fibrocytärer Narbenbildung mit unvollkommener Funktionalität und im Verlauf zu Schädigungen des Knorpels, die sich in Krankheitsbildern wie z.B. Arthritis äußern [Engvist & Johnsson, 1980; Ohlsen, 1976; Skoog et al., 1972]. Daher gibt es ein außerordentliches Interesse Knorpel zur Regeneration zu bringen.

Dementsprechend sind die Fortschritte im Bereich des *in-vitro* geschaffenen Knorpels auch bereits bemerkenswert. So existieren heute bereits Konstrukte aus Polyurethan- oder Polyethylengeflechten, die mit Knorpelzellen besiedelt und durch anschließende Kultivierung in rotierenden Bioreaktoren zu histologisch nahezu natürlichem Knorpelgewebe entwickelt werden konnten [Freed et al., 1998].

Die großen Fortschritte in der Entwicklung von *in-vitro* erzeugtem Knorpel, die vor allem auf dessen positiven Eigenschaften der fehlenden Vaskularisation und Innervation, sowie seines monozellulärer Aufbaus beruhen, machen Knorpel zu einem idealen Modellgewebe für die Organregeneration. Der momentan einzige limitierende Faktor bei der Anzucht größerer Mengen Knorpelzellen besteht in den zellbiologischen Eigenschaften der Knorpelzellen, die - ähnlich wie es bereits Hayflick und Moorhead für andere Zelltypen gezeigt haben [Hayflick & Moorhead, 1961] - keine beliebige Vermehrung primärer Zellen *in-vitro* zulassen. Um eine Veränderung dieser Eigenschaften zu erreichen, und somit eine beliebige Vermehrung der Knorpelzellen *in-vitro* zuzulassen, ist eine detaillierte Analyse der Differenzierungsprozesse bei der Knorpelgewebeentwicklung notwendig, die letztlich über die Proliferationseigenschaften der Zelle entscheiden.

Ausgehend von der Entwicklungsbiologie ist in den vergangenen Jahren die Aufklärung von Differenzierungsprozessen bei der Gewebeentwicklung fortgeschritten und es sind bestimmte Gene isoliert worden, die bei der Steuerung der Zellteilung und der Differenzierung von Zellen eine zentrale Rolle spielen.

Bezüglich des Zellteilungsverhaltens einer Zelle unterscheidet man zellbiologisch verschiedene Zustände, die als Proliferation, Quieszenz, Seneszenz und terminale Differenzierung bezeichnet werden. Der Zustand der Proliferation, also der Massenzunahme mit anschließender Teilung steht dabei im Gegensatz zu den postmitotischen Zuständen der altersbedingten Seneszenz, der terminalen Differenzierung und der Quieszenz einer Zelle. Die Quieszenz ist im Unterschied zur Seneszenz und terminalen Differenzierung eine reversible Form des Zellzyklusarrest und erlaubt unter bestimmten Stimulationsbedingungen ein Wiedereintreten in den Zellzyklus.

Auf molekularer Ebene werden diese unterschiedlichen zellbiologischen Zustände durch spezifische Expressionsmuster bestimmter Zellzyklusregulatoren beeinflusst. Das Fortschreiten durch die erste Ruhephase (G1) über den G1-Restriktionspunkt hinweg und die Initiation der DNA-Synthese (S-Phase) im Mammalier-Zellzyklus wird positiv durch die Zyklinabhängigen-Kinasen (CDKs) [Morgen, 1997] und deren aktivierende Untereinheiten, die Zykline und negativ durch Zyklinabhängige-Kinaseinhibitoren (CKIs) der CIP/KIP- und der INK4-Familie reguliert [Sherr, 1993; Sherr & Roberts, 1999]. Dabei kommt es über die durch die Zykline aktivierten Zyklinabhängigen-Kinasen zu einer Phosphorylierung der Proteine der Rb-Familie, die ihrerseits dadurch eine Konformationsänderung erfahren und damit an sie gebundene Transkriptionsfaktoren freisetzen. Die Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine können diese Phosphorylierung der Proteine der Rb-Familie durch reversible Bindung an die Zykline, aber auch an die Zyklinabhängigen-Kinasen verhindern.

Die sich daraus ergebende Möglichkeit, die Differenzierung und Proliferationsraten von Zellen über die Expression der Proteine der Familie der Zykline, der Zyklinabhängigen-Kinasen, der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren, oder der Rb-Familie zu beeinflussen, eröffnet der Regenerationsbiologie Chancen für die nahezu beliebige Vermehrung von Zellen und damit auch für die Regeneration von Zell-, Gewebe- und Organsystemen.

Ein Ansatz der molekular gesteuerten Regeneration besteht darin, die natürliche Proliferationshemmung von Zellen durch die Kontrolle verschiedener Zellzyklusregulatoren auf molekularer Ebene aufzuheben und damit zelluläre Regeneration - also erneute Proliferation von Zellen in einem bereits ausdifferenzierten Zellverband - einzuleiten. Dazu ist es nötig, die Expressionsmuster der unterschiedlichen Zellzyklusregulatoren in der gewünschten Zell- oder Gewebeart zu analysieren, sowie die einzelnen Funktionen der Regulatoren in dem entsprechenden Gewebe zu entschlüsseln.

Knorpel bietet sich - durch seine oben genannten Eigenschaften - als einfach strukturiertes Modellsystem zur Proliferations- und Differenzierungskontrolle an, da es quantitative und funktionelle Analysen in einem einfachen Gewebeverband ermöglicht. Darüber hinaus hat die Erweiterung der Kenntnis der Proliferationskontrolle in Knorpel den Vorteil, die gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf die Herstellung von *in-vitro* Knorpelgewebe zur Gewebetransplantation nutzen zu können.

In jüngster Zeit ist es nicht nur gelungen, die oben genannten Proteine der Zyklin-, der Zyklinabhängigen-Kinase-, der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitor- oder der Rb-Familie zu identifizieren, sondern auch deren Expression sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene in unterschiedlichen Geweben und Zellkulturen nachzuweisen. In Analogie soll in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster von den in humanem Knorpelgewebe eventuell vertretenen Zellzyklusregulatoren des G1/S-Übergangs der Zykline A, D1 und E, der Zyklinabhängigen-Kinasen CDK 2, CDK 4 und CDK 6, der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} und der Rb-Familie pRb, p107 und p130 erstellt, sowie ihre Expression in unterschiedlichen Kulturstadien kultivierter humaner Chondrocyten analysiert werden. Die Zellzyklusregulatoren, die in unterschiedlichen Kulturstadien veränderte Expressionsmuster zeigen, sind gleichermaßen Kandidatengene, die an der Differenzierung und dem Proliferationsverhalten der Knorpelzellen beteiligt sein können.

Das Fernziel dieser Untersuchungen ist es, die kontrollierte Vermehrung humaner Chondrocyten *in vitro* zu ermöglichen, um damit eine Grundlage für die Entwicklung autologer Knorpeltransplantate mit Hilfe des Tissue-Engineering zu schaffen. Darüber hinaus kann das im Knorpelmodell gewonnene Wissen auf die unterschiedlichsten Gewebetypen übertragen werden, was somit die Schaffung eines generellen Modells für den Organersatz ermöglicht.

Kapitel 2:

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Zellen & Gewebe

Humane Chondrocyten wurden aus frischen Nasenscheidewand-Bruchstücken isoliert, die bei *Septumplastiken* in der HNO-Klinik Tübingen als Biopsiematerial anfielen. Die als Kontrollkulturen verwendeten Hela-Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. M. Spiegel (medizinische Klinik, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Als weitere Kontrollzelllinie wurden humane Lungenfibroblasten vom Typ Wi-38 (ATCC No. CCL-75) verwendet. Alle Zellen wurden unter Zusatz von fetalem Kälberserum (Chargen Nr. S553) der Firma Biochrom/Seromed (Berlin) kultiviert. Für die Immunhistochemie, sowie die Protein- und RNA-Isolation wurden frische Nasenscheidewand-Bruchstücke präpariert. Das als Kontrollgewebe dienende Gewebe humaner Tonsillen (Gaumenmandel = Tonsilla palatina) fiel bei *Tonsillektomien* in der HNO-Klinik Tübingen als Biopsiematerial an. Für die Verwendung von humanem Material lag ein bewilligter Ethik-Antrag der Universität Tübingen vor.

Immuncytochemie

Als Primärantikörper wurden verschiedene subtypspezifische Primärantikörper gegen Zykline, Zyklinabhängige-Kinasen, Zyklinabhängige-Kinaseinhibitoren, Proliferationsmarker und Matrixproteine verwendet. In Tabelle 1 (S. 13) sind Hersteller, Subtypen, Klone, Spezies und die jeweiligen für die Immunfärbungen oder Western-Blots verwendeten Verdünnungen aufgezeigt.

Für die Western-Blots wurde als Positivkontrolle für p57^{KIP2} das entsprechende "human cell-17" Total-Protein Zell-Lysat der Firma Neomarkers (Fremont, USA) verwendet.

Als Sekundärantikörper wurden Fluorescein verknüpfte Ziege anti-Kaninchen-IgG (F-0511), Kaninchen anti-Ziege-IgG (F-2016) von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Schaf anti-Maus-IgG (N 1031) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Der DAB-Markierung diente das LASB[®]+ Kit *HRP* der Firma DAKO (Hamburg). Des weiteren kamen monoklonale Meerrettichperoxidase konjugierte Ziege anti-Maus-IgG Sekundärantikörper der Firma Bio-Rad (München) in Verbindung mit dem Renaissance[®] Western-Blot Chemiluminescence Reagent *Plus* (NEL 104) der Firma NEN (Boston, USA) bei den Immunoblots zur Anwendung. Geblottet wurde auf PVDF Membranen der Firma NEN (Boston, USA).

Vitalitätskontrolle

Für die Bestimmung der Vitalitätsraten kultivierter Zellen wurde das Live-Dead[®] Viability/Cytotoxicity Kit No L 3224 der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) verwendet.

RNA Isolation & Detektion

Für die Isolation der Total-RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das für den Ribonuclease-Protection-Assay (RPA) benötigte cDNA Multi Probe Template Set (hCC-2) wurde ebenso wie das Ribo Quant™ RNase Protection-Assay Kit und das Ribo Quant™ *In Vitro* Transcription Kit von der Firma Becton Dickinson-Pharmingen (Heidelberg) bezogen. Zur radioaktiven Markierung kam [α - 32 P]UTP der Firma NEN (Köln) zur Anwendung. Die Auswertung der Northern Blots erfolgte über die Image Master 1D Software der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

Antisense

Die verschiedenen p27 und p57 Antisense Nukleotide wurden von der Firma Biognostik GmbH (Göttingen) synthetisiert, während das als Cytosektionsagens verwendete Cytocfectin GSV von der Firma Glen Research (Virginia, USA) bezogen wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologie

Für die histologischen Färbungen wurden 10 μ m dicke Kryostatschnitte an einem Leica-Jung CMT 3000 Kryostaten mit Objektkühlung angefertigt. Die humanen Knorpelstücke und die als Kontrollgewebe dienenden Stücke humanen Tonsillengewebes wurden zuvor 2 h bei 4°C in 2% Paraformalin, pH 7,4 (200 mOsm) fixiert. Nach einmaligem kurzes waschen in 1x PBS wurden die Gewebestücke für jeweils 30 min in einer aufsteigenden Sucrose-Reihe (320 mM, 500 mM, 720 mM) zur Kryoprotektion im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert, in Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude Holland) eingebettet und anschließend in Methylbutan/N₂ schockgefroren. Bis zum Schneiden wurden die Präparate nach der Einbettung bei -70°C zwischengelagert. Die Schnitte wurden auf Superfrost® Plus Objektträger der Firma Langenbrinck (Emmendingen) aufgezogen und nach 2 h Lufttrocknung bei -20°C bis zur eigentlichen Färbung gelagert.

Folgende Protokolle kamen bei den histologischen Färbungen zur Anwendung:

2.2.1.1 Safranin O

- Schnitte in PBS waschen
- 10' in 2% Safranin O in PBS 1x färben
- Waschen mit PBS
- Eindeckeln

2.2.1.2 Alzian Blau

- 3' in 3% Essigsäure einstellen
- 30' in 1% Alcianblau GX in 3% Essigsäure (pH 2,5) färben
- Abspülen in 3% Essigsäure
- Waschen in Aqua dest.
- Eindeckeln

2.2.1.3 Hämatoxilin-Eosin

Weigertsches Eisenhämatoxylin

- 1 g Hämatoxylin in 100 ml EtOH (96%) lösen
- 1,5 g Eisen-(III)-Chlorid in 100 ml Aqua dest. dest. lösen und mit 1 ml HCl ansäuern
- beide Lösungen direkt vor Gebrauch 1:1 mischen

Meters Eosin

- 0,4 g Biebrich Scharlach, 5 g Eosin Y und 2,1 g Phloxin B in 200 ml EtOH (96%) lösen und anschließend mit 800 ml Aqua dest. dest. mischen
- Schnitte 10' mit Weigertschem Eisenhämatoxylin färben
- anschließend 2' in Meters Eosin färben
- Waschen in Aqua dest.
- Eindeckeln

2.2.1.4 Trichrom-Mallory

Weigertsches Eisenhämatoxylin (siehe 2.2.1.3)

Biebrich-Scharlach/Säurefuchsin

- 1 g Biebrich-Scharlach in 100 ml Aqua dest. lösen
- 1 g Säurefuchsin in 100 ml Aqua dest.
- 90 ml der Biebrich-Scharlach-Lösung mit 10 ml der Säurefuchsin-Lösung und 1 ml Eisessig mischen und vor Gebrauch filtrieren
- Schnitte in Wasser bringen
- 10' mit Weigertsches Eisenhämatoxylin färben
- Abspülen in Aqua dest.
- 2' mit frisch filtriertem Biebrich-Scharlach/Säurefuchsin-Eisessig färben
- Abspülen in Aqua dest.
- 10-15' in 2,5%iger Phosphormolybdänsäure differenzieren
- 5' mit 25 mg/ ml Anilinblau in 2%iger Essigsäure färben
- Abspülen in Aqua dest.
- 3-5' in 1% Essigsäure differenzieren

2.2.2 Dissoziation von Gewebe für die Zellkultur

Frisches humanes Knorpelgewebe, das bei *Septum-choncho* Operationen in der HNO-Klinik Tübingen als Biopsiematerial anfiel, wurde unter sterilen Bedingungen in 1x Hank's Salz-Lösung ohne Ca^{++} , Mg^{++} (Biochrom/Seromed, Berlin) mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert und anschließend in Gegenwart von 2 mg/ml Kollagenase II (Biochrom/Seromed, Berlin), 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Serva, Berlin), 0,15 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim) und 10 µg/ml (10000U) Penstrep (Biochrom/Seromed, Berlin) in 1x Hank's Salz-Lösung ohne Ca^{++} , Mg^{++} (Biochrom/Seromed, Berlin) bei 37°C im Schüttelbrutschrank für 18 h verdaut. Die daraus erhaltene Zellsuspension wurde steril durch 70 µm Zellsiebe filtriert, anschließend 5' bei 37°C und 1000 rpm abzentrifugiert und drei mal in sterilem 1x PBS gewaschen. Nach Ermitteln der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen bei $\approx 5 \times 10^4$ Zellen/ml in Kulturflaschen ausgesät.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Monolayer-Kultur

Alle Zelltypen wurden in sterilem 1x DMEM/HAM's F12 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom/Seromed, Berlin) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum kultiviert (37°C, 5% CO₂-Begasung, Heraeus Inkubator). Bei Versuchen unter reduzierten Serumbedingungen ('ls' für low serum) wurden hier nur 0,1% fötales Kälberserum eingesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin-EDTA (Life Technologies, Eggenstein) trypsiniert, passagiert und weiterkultiviert. Im Falle der humanen Chondrocyten geschah dies bis zur Einstellung ihrer Teilungsfähigkeit. Die jeweils zu untersuchende Passage wurde bei 3×10^4 Zellen/ml auf 8-Kammer-Gewebekultur-Glasobjektträger ausgesät.

2.2.3.2 Proliferationskontrolle mittels BrdU

Nach Erreichen von $\approx 70\%$ iger Konfluenz wurde das Kulturmedium aus den einzelnen Kammern abgesaugt und die Zellen für 3 h (37°C, 5% CO₂-Begasung) mit einer 10 µM 1,5-Bromo-2'-deoxy-Uridin-Lösung (BrdU) in sterilem Kulturmedium inkubiert. Nach Absaugen des BrdU-Markierungsmediums und dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen für 20' bei -20°C mit 70% EtOH in 50 mM Glycin-Puffer (pH 2,0) fixiert. Erneut dreimaligen Waschen in 1x PBS folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt mit Anti-BrdU Antikörper. Die BrdU-Markierung wurde über einen Fluorescein verknüpften Schaf anti-Maus Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Auswertung und Analyse der Färbung erfolgte an einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop AX 70.

2.2.3.3 Vitalfärbung

Für die Vitalitätsprüfung der Kulturen wurde nach Erreichen von $\approx 70\%$ iger Konfluenz das Kulturmedium aus den 8-Kammer-Objektträgern abgesaugt und die einzelnen Kammern mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 30' bei 37°C mit jeweils 250 μl Färbelösung (1 μl 4 μM Ethidium Homodimer, 1 μl 2 μM Calcein-AM in 4 ml 1x PBS) pro Kammer inkubiert. Die frisch gefärbten Zellkulturen wurden nicht fixiert, sondern mit PBS befeuchtet und sofort mit einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung und Analyse der Färbung erfolgte an einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop AX 70.

2.2.4 Immunhistochemie

Zur Detektion der verschiedenen Zellzyklusregulatoren in Knorpel- und Kontrollgewebe wurden Kryostatschnitte angefertigt. Dazu wurde das Knorpelgewebe und das zur Kontrolle verwendete Tonsillengewebe (Tonsilla palatina) 2 h in 2% Paraformalin, pH 7,4, 200 mOsm bei 4°C im Überkopfschüttler fixiert, nach einem kurzen Waschschriff in einer aufsteigenden Succhrosereihe (jeweils 30' bei 4°C 320 mM, 500 mM, 720 mM) zur Kryoprotektion inkubiert und schließlich in Methylbutan/N₂ schockgefroren. Die Präparate wurden bis zum Schneiden auf einem Leica Jung CM 3000 Kryostat mit Objektkühlung bei -70°C zwischengelagert. Die einzelnen Schnitte (Knorpelgewebe: 12 μM ; Tonsillengewebe: 10 μM) wurden auf Superfrost*/Plus Objektträger der Firma Langenbrinck (Emmendingen) aufgezogen, bei Raumtemperatur für 30' (Tonsille) beziehungsweise über Nacht (Knorpel) luftgetrocknet und dann bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Bei den immunhistochemischen Färbemethoden wurde auf unterschiedliche Verfahren zurückgegriffen. Als Primärantikörper wurden verschiedene Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen verwendet [Tab. 1, folgende Seite].

Die Färbungen an Zellkulturen wurden als Fluoreszenzmarkierungen mit Fluorescein verknüpften Sekundärantikörpern der Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Erreichen von $\approx 70\%$ iger Konfluenz mit 4% Paraformalin für 10' bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in 1x PBS gewaschen. Nach einem dreiminütigem Permeabilisierungsschritt mit 0,1% Triton X-100-PBS bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut in 1x PBS gewaschen und daraufhin bei 37°C in einer feuchten Kammer für 30' mit 1% PBS/BSA geblockt. Dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation der Zellen bei 4°C mit der jeweiligen Primärantikörperverdünnung in 0,5% PBS-BSA über Nacht, und schließlich nach erneutem mehrmaligen Waschen die Inkubation mit den passenden Sekundärantikörpern für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach drei Waschschriffen wurden die Zellen mit 0,03 μl TRITC-Phalloidin/ml PBS 10' bei Raumtemperatur im Dunkeln gegengefärbt und schließlich, nach neuerlichem dreimaligem Waschen mit Vectashield+Dapi (Vector, Burlingame - USA) eingedeckelt. Die

Antikörper	Klon		Verdünnung	Firma
Immunhistologie				
p15 ^{INK4b}	K-18	Kaninchen monoklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p16 ^{INK4a}	ZJ11	Maus monoklonal	1:20	NeoMarkers (Fremont/USA)
p18 ^{INK4c}	M-168	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p19 ^{INK4d}	M-167	Kaninchen monoklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p21 ^{CIP1/WAF1}	EA 10	Maus monoklonal	1:20	Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden)
	C-10	Kaninchen monoklonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p27 ^{KIP1}	DCS-72.F6	Maus monoklonal	1:25	NeoMarkers (Fremont/USA)
	N-20	Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p57 ^{KIP2}	H-91	Kaninchen polyklonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
pRb	G3-245	Maus monoklonal	1:50	Becton Dickinson Pharmingen (Heidelberg)
	C-15	Kaninchen polyklonal	1:750	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p107	C-18	Kaninchen polyklonal	1:750	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
p130	C-20	Kaninchen polyklonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
CDK 2	H-298	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
CDK 4	H-303	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
CDK 6	C-21	Kaninchen polyklonal	1:1500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Cyklin A	H-432	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Cyklin D1	Ab-3	Maus monoklonal	1:20	Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden)
CyklinE	Ab-1	Maus monoklonal	1:25	Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden)
Kollagen I	AB758	Ziege polyklonal	1:30	Chemicon (Hofheim/Ts)
Kollagen II	AB759	Ziege polyklonal	1:30	Chemicon (Hofheim/Ts)
Kollagen X	X-AC9	Maus monoklonal	1:50	NeoMarkers (Fremont/USA)
Proteoglykan	BMS4003	Maus monoklonal	1:200	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
BrdU	BMG 6H8	Maus monoklonal	1:20	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Western-Blot				
p57 ^{KIP2}	57-P05	Maus monoklonal	1:200	NeoMarkers (Fremont/USA)

Tab. 1 Darstellung der verwendeten Antikörper und ihrer jeweiligen Verdünnungen in den immunhistochemischen Färbungen und Western-Blots.

Auswertung und Analyse der Färbung erfolgte an einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop AX 70. Als Negativkontrollen dienten bei jedem Färbedurchgang Zellkulturen ohne Primärantikörper, oder alternativ, durch Zugabe von zehnfachem Überschuß des spezifischen Kontrollpeptids präabsorbierte Primärantikörper.

Die Färbungen an Knorpel- und Tonsillengewebe wurden unter Zuhilfenahme des DAKO (Hamburg) LSAB[®]+ Kits *HRP* (K 0579) und dem hintergrundreduzierendem Antikörper-Verdünnungsmedium (S 3022) der selben Firma nach Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung und Analyse erfolgte wiederum an einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop AX 70 mittels Normarski-Phaseninterferenzkontrast-Modus.

2.2.5 Western-Blot

Proteinaufbereitung

Zur Detektion und Identifizierung der molekularen Größe der verschiedenen Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorprotein-Familien wurden humane Chondrocyten und Hela-Zellen in Lysispuffer (0,5% NP40; 50 mM TRIS HCl, pH 8,0; 200 mM NaCl; 20 mM NaF, 20 mM β -Glycerophosphat, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$) unter Zusatz von 0,024 g/ml Pefabloc (Roth, Karlsruhe) für 30' auf Eis lysiert, und anschließend bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils auf die darin enthaltene Proteinmenge untersucht (Proteinbestimmung nach Bradford).

Die Proteine wurden durch Zugabe von 2 Teilen MeOH und anschließender Zentrifugation (30''/12000 rpm), Zugabe von einem Teil Chlorophorm und anschließender Zentrifugation (30''/12000 rpm), sowie darauf folgender Zugabe von einem Teil Aqua dest. und anschließender Zentrifugation (3'/12000 rpm) präzipitiert. Nach Verwerfen der oberen MeOH-Phase wurden erneut 1,5 Teile MeOH zur Chlorophorm-Phase zugegeben und anschließend die Proteine 5' bei 12000 rpm pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet zu 3,3 μ g/ μ l in 1x Sample-Buffer (400 mM TRIS; 34 mM SDS; 66 mM EDTA; 87% Glycerin, pH 8,0; 0,14 mM Bromphenolblau; 32 mM DTT) aufgenommen, 5' bei 100°C gekocht und schließlich 2' bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Immunoblot

60 μ g/ μ l Protein aus Knorpelgewebe und 100 μ g/ μ l Protein aus Zellkulturüberständen wurden auf ein 12% (CIP/KIP-Familie) bzw. 15% (INK4-Familie) SDS-Polyacrylamid-Gel (PAGE) aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen (NEN, Boston, USA) transferiert und die Membranen daraufhin für 1 h mit 2% Milchpulver in 0,1% Tween-PBS blockiert. Im Anschluß daran erfolgte bei 4°C über Nacht die Inkubation mit den verdünnten Primärantikörpern (Verdünnungen in 0,2% Milchpulver in 0,1% Tween-PBS, Klon und Hersteller und Verdünnung siehe S. 15, Tabelle 1, Teil Western-Blot). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween-PBS erfolgte eine 1-stündige Inku-

bation mit den Meerrettichperoxidase konjugierten Zweitantikörpern (Verdünnung: 1:10000 in 0,2% Milchpulver in 0,1% Tween-PBS) bei Raumtemperatur. Die Antigendetektion erfolgte nach drei weiteren Waschschritten mit 0,1% Tween-PBS mit dem Renaissance® Western-Blot Chemiluminescence Reagent *Plus* (NEL 104) der Firma NEN (Boston, USA) auf medizinischen Röntgenfilm Curix HT1.000G Plus der Firma Agfa-Geveart (Mortsel, Belgien).

”Strippen” der PVDF-Membranen

Nach Ausbelichtung der Chemilumineszenz-markierten PVDF-Membranen auf Röntgenfilm wurden die Membranen zur erneuten Antikörpermarkierung durch 30-minütige Inkubation bei 50°C in ”Stripping-buffer” (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol) und anschließendem viermaligem Waschen in Tween-PBS von der vorhergehenden Antikörpermarkierung befreit. Der Erfolg des ”Strippens” wurde schließlich durch erneute 1-minütige Inkubation im Chemilumineszenz-Reagens und darauf folgender 1-stündiger Belichtung eines Röntgenfilmes überprüft.

2.2.6 Ribonuclease-Protection-Assay

RNA-Isolation

Die Isolation von Total-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini Kits der Firma Quiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers ausgeführt.

Synthese der Ribo-Sonden

Die für den RPA benötigten radioaktiven Sonden wurden wie folgt markiert: Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des *In-Vitro* Transcription Kits (Becton Dickinson-Pharmingen, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers unter Zugabe von 10 µl [α - 32 P]UTP (NEN, Köln) und 1 µl eines entsprechenden cDNA Multi-Template (RiboQuant™ RPA Template Set hCC-2; Becton Dickinson-Pharmingen, Heidelberg), synthetisiert. Die synthetisierten Sonden wurden anschließend im Szintillationsmessgerät auf das inkorporierte [α - 32 P]UTP überprüft. Markierte Proben wiesen typischerweise einen Wert von $\sim 3 \times 10^6$ Cherenkov counts/µl auf. Bis zur Hybridisierung mit der Ziel RNA wurden die Sonden bei -20°C aufbewahrt.

Ribonuclease-Protection-Assay

6 µg der zuvor isolierten RNA und 2 µl der 10-fach verdünnten radioaktiven Sonden wurden im folgenden über Nacht hybridisiert und schließlich mit RNase verdaut. Bei der Hybridisierung kommt es zu einer Verbindung der einzelsträngigen, radioaktiven cDNA-Sonden mit der isolierten, ebenfalls einzelsträngigen RNA. Im anschließenden RNA-Verdau werden sämtliche nicht hybridisierten RNA Bestandteile abgebaut, so daß nur geschützte cDNA-RNA Proben zurück bleiben. Alle Schritte fan-

den unter Zuhilfenahme des RPA-Kits der Firma Becton Dickinson-Pharmingen (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers statt. Als Positivkontrolle dienten 2 µg Hela-RNA (Bestandteil des RiboQuant™ Template-Sets) und 1000-2000 cpm/lane der ungeschützten, nicht verdauten radioaktiven Sonde. Als Negativkontrolle wurden 2 µg Hefe tRNA (Bestandteil des RPA-Kits) verwendet. Alle Proben wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel (SequaGel XR, National Diagnostics, Atlanta/USA) aufgebracht und elektrophoretisch aufgetrennt. Die im Vakuumgeltrockner getrockneten Gele wurden schließlich für 1 h, 2 h, 4 h und 8 h bei -70°C auf Kodak X-Omat AR (Kodak, Rochester/USA) autoradiographisch belichtet und die Filme anschließend entwickelt.

Kapitel 3:

ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung und Charakterisierung von humanem Knorpelgewebe und dissoziierten Zellen

Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren in humanem Knorpelgewebe und kultivierten humanen Chondrocyten. Hierfür ist die Identifizierung und Charakterisierung von Knorpelgewebe und Chondrocyten, sowie die Identifizierung des Differenzierungsgrades der verschiedenen Passagen kultivierter Chondrocyten wünschenswert.

3.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchung von histologischen Knorpelgewebspräparaten

In einem ersten Ansatz wurde frisches humanes Knorpelgewebe, das bei Patienten als Biopsiematerial während *Septumplastiken* entnommen wurde, im Normarski-Interferenzphasenkontrast, sowie mit verschiedenen histologischen Färbemethoden auf seine Struktur hin untersucht.

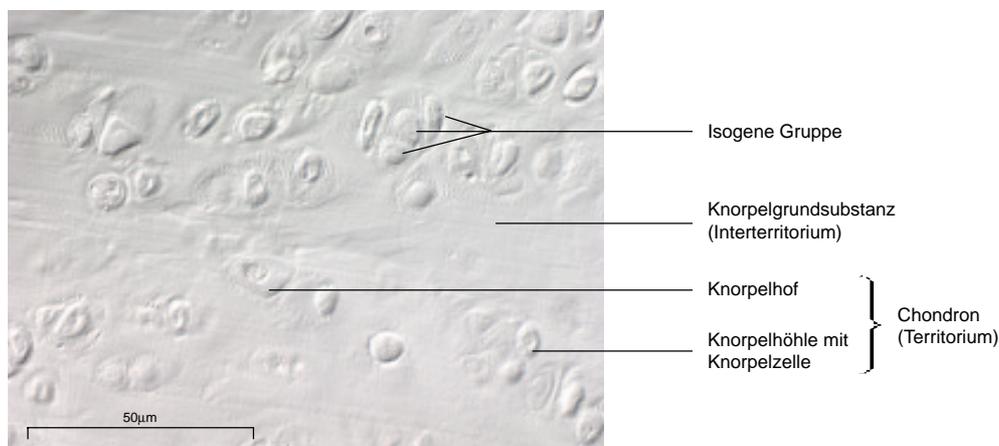


Abb. 1 Phaseninterferenzkontrastaufnahme hyalinen Knorpels. Die Chondrocyten liegen in Knorpelhöhlen. Sie kommen einzeln vor oder bilden isogene Gruppen und werden jeweils von einem kollagenarmen und zugleich proteoglykanreichen Knorpelhof umgeben. Zwischen den Knorpelhöfen befindet sich die weitgehend unstrukturierte Grundsubstanz. Maßstab = 50μm.

Frisches Knorpelgewebe hat ein milchig durchscheinendes bis bläulich gelbes Aussehen. Im Phaseninterferenzkontrast lassen sich deutlich die Strukturen hyalinen Knorpels identifizieren [Abb. 1]. Die Chondrocyten liegen einzeln oder in - durch interstitielles Wachstum entstandenen - isogenen Gruppen zusammen. Jeder einzelne Chondrocyt liegt dabei in einer Knorpelhöhle, die wiederum von ei-

nem kollagenarmen, aber proteoglykanreichen Knorpelhof umgeben wird. Diese Knorpelhöfe erscheinen lichtmikroskopisch etwas dunkler. Die Chondrocyten bilden zusammen mit den Knorpelhöfen die sogenannten Territorien oder Chondrone, welche von der unstrukturierten Grundsubstanz oder den sog. Interterritorien umgeben werden.

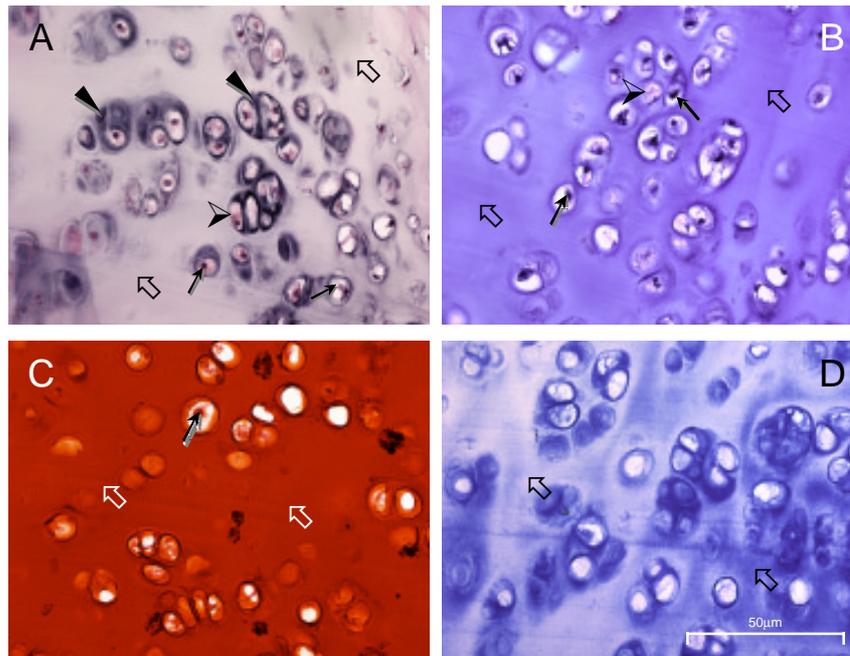


Abb. 2 Histologische Färbungen humanem Nasenseptum-Knorpels. 5A: Hämatoxylin-Eosin, 5B: Trichrom-Masson, 5C: Safranin-O, 5D: Alcian-Blau. ↑ = Zellkerne, ➤ = Cytoplasma, ↻ = Grundsubstanz, ◀ = Knorpelhöfe. Maßstab = 50µm.

Die Bestandteile der unstrukturierten Matrix des Knorpelgewebes, ein direktes Korrelat des Reife- und Differenzierungsgrades der Zellen, können durch histologische Färbemethoden bestimmt werden. Abbildung 2A zeigt eine Hämatoxylin-Eosin Färbung humanen Nasenseptum-Knorpels. Die Zellkerne werden bei dieser Methode schwarz angefärbt [Abb. 2A, ↑], während sich das Cytoplasma durch Eosin hellrosa abhebt [Abb. 2A, ➤]. Durch ihren stark basophilen Charakter färbt sich die Knorpelgrundsubstanz [Abb. 2A, ↻], besonders aber die proteoglykanreichen Knorpelhöfe [Abb. 2A, ◀] blau bis lila an. Speziell der Identifizierung von Kollagenen dient die Trichrom Färbemethode nach Masson [Abb. 2B]. Zellkerne werden durch Hämatoxylin schwarz [Abb. 2B, ↑] und das Cytoplasma - durch Biebrich-Scharlach/Säure-Fuchsin-Lösung - rot angefärbt [Abb. 2B, ↻]. Kollagene erscheinen bei der lichtmikroskopischen Betrachtung blau [Abb. 2B, ↻]. Durch Safranin-O werden die sauren Mukosubstanzen der Knorpelmatrix (d.h. alle Polysaccharide mit mehr als 4%

Zuckeranteil) [Abb. 2C, ↗], sowie die Zellkerne rot angefärbt [Abb. 2C, ↗]. Von den sauren Mukosubstanzen werden speziell die sulfatierten Mukopolysaccharide (z.B. Keratansulfat oder Chondroitinsulfat) durch Alcian-Blau dunkelblau markiert [Abb. 2D, ↗], während jedoch die Zellkerne ungefärbt bleiben.

3.1.2 Immunhistologische Untersuchung auf knorpel- und bindegewebs-spezifische Marker

Distinkte Gewebetypen werden durch individuelle Matrixproteine (z.B. Kollagene) charakterisiert. Eine suptypspezifische Charakterisierung der unterschiedlichen Matrixproteine ist mit Hilfe von Antikörpern möglich. In einem ersten Ansatz wurde die Spezifität von Antikörpern gegen bindegewebspezifisches Kollagen I, und knorpelspezifisches Kollagen II, sowie Knorpelproteoglykane (PGA) in Bindegewebe-freiem humanem Nasenseptum im Vergleich zu Bindegewebe-enthaltenden Strukturen humaner *Tonsilla palatina* (Gaumenmandel) verifiziert.

Abbildung 3A (S. 21) zeigt, daß die die Knorpelzellen umgebende Matrix im Knorpel humanem Nasenseptumgewebes frei von jeglicher Immunreaktion gegen bindegewebspezifisches Kollagen I ist. Im Gegensatz dazu läßt sich Kollagen II in der gesamten, die Zellen umgebenden extrazellulären Matrix immunhistochemisch nachweisen [Abb. 3C]. Ähnliches zeigt sich auch in der Immunfärbung gegen Knorpelproteoglykane [Abb. 3E; PGA]. Weite Bereiche der Knorpelmatrix weisen hier eine Immunfärbung auf. In den bindegewebigen Bereichen humanem Tonsillengewebes zeigt Kollagen I im Gegensatz zum Nasenseptum eine deutliche Reaktion [Abb. 3B], während sich keine Färbungen gegen Kollagen II [Abb. 3D] und Knorpelproteoglykane [Abb. 3F; PGA] detektieren lassen. Eine schwache Immunreaktion gegen Kollagen II kann nur im inneren Bereich der Gefäße, die das Bindegewebe durchziehen, nachgewiesen werden [Abb. 3D, ↘]. Zur Bestätigung der Spezifität der Immunreaktionen wurden die Primärantikörper weggelassen. In diesen Färbungen sind weder bei Knorpelgewebe [Abb. 3G] noch bei Tonsillengewebe [Abb. 3H] Immunreaktionen zu erkennen.

3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von kultivierten Chondrocyten

Die Analyse der Manipulierbarkeit des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens kultivierter humaner Chondrocyten erfordert die Detektion und Markierung der unterschiedlichen Differenzierungszustände *in-vitro*. Dazu soll in einem ersten Ansatz der in Kultur sich sukzessiv verändernde morphologische Habitus der Zellen beschrieben werden (Kap. 3.1.3), dem in einem zweiten Ansatz ein distinktes Expressionsmuster unterschiedlicher Matrixproteine zugeordnet werden soll (Kap. 3.1.4). Der Differenzierungsgrad der Chondrocyten verändert sich mit der Zahl der Zellteilungen in Kultur. Die Anzahl der von den kultivierten Chondrocyten durchlaufenen Zellteilungen läßt sich durch wiederholte Aufteilung (Passage) von konfluent gewachsenen Zellen beeinflussen.

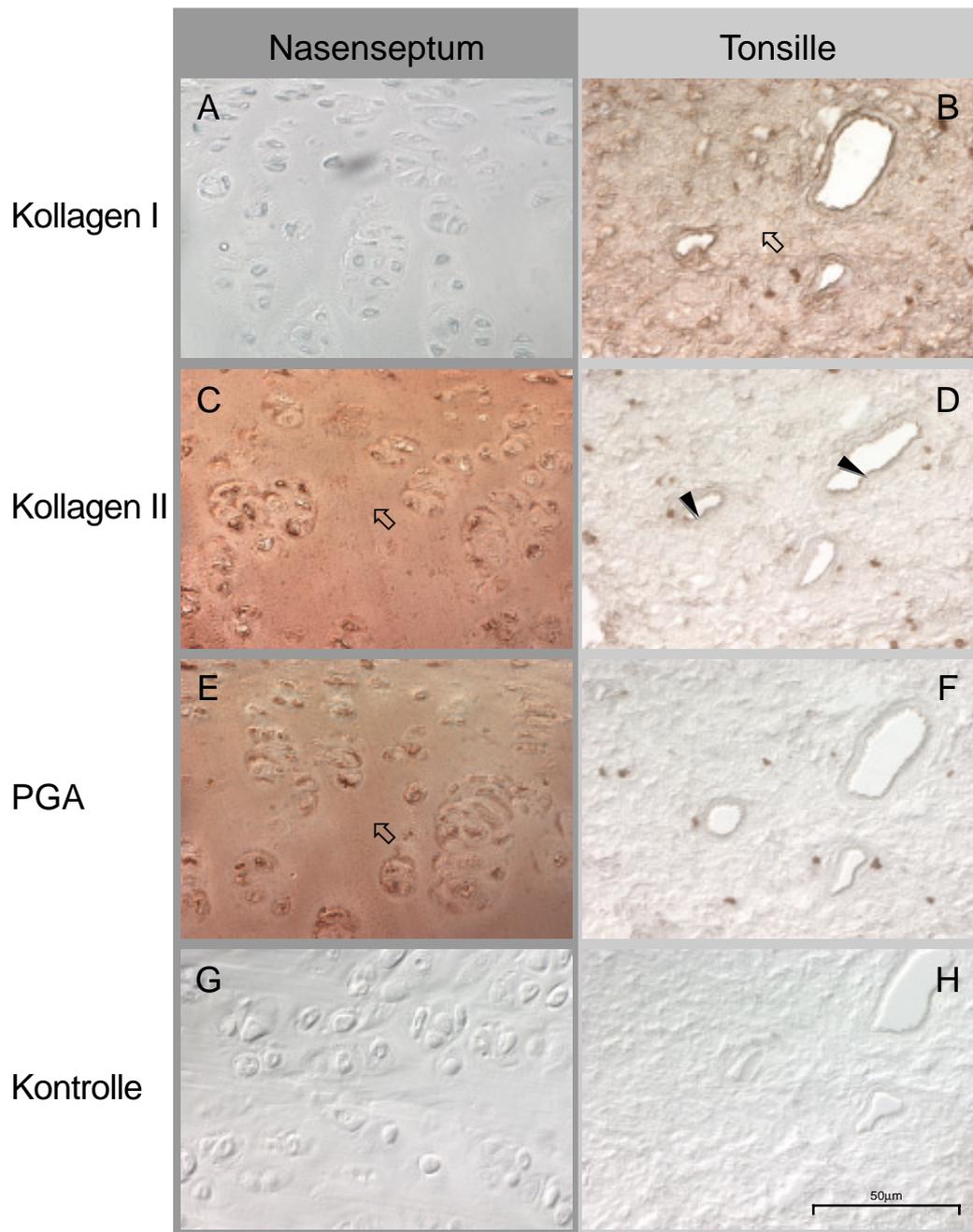


Abb. 3 Immunhistochemischer Nachweis verschiedener Matrixproteine in humanem Nasenseptum-Knorpel und humanem Tonsillengewebe, sowie Darstellung der Spezifität des Sekundäntikörpers. \square = Immunantwort in Grundsubstanz, \blacktriangle = Immunreaktion in Gefäßwand. Maßstab = 50 μ m.

Die in Abbildung 4 gezeigten Phaseninterferenzkontrastaufnahmen kultivierter Chondrocyten nach unterschiedlichen Passagen demonstrieren die Veränderung des Aussehens der Zellen im Verlauf der Kultivierung. Weisen die Chondrocyten zu Beginn ihrer Kultivierung (Passage 2) noch einen grob polygonalen Habitus auf [Abb. 4A und B], so verändert sich dieser in späteren Passagen (Passage 8) zu einem längs gestreckten, fibroblastenartigen Aussehen [Abb. 4C und D]. Diese Veränderung des Aussehens geht auch mit einem unterschiedlich ausgeprägtem Hang zur Gruppenbildung einher. Liegen die Chondrocyten in frühen Passagen der Kultur (Passage 2) noch meist als einzelne Zellen vor, so bilden sie mit zunehmender Kulturdauer (Passage 8) vermehrt Gruppen, die sich bei der Passagierung nur schwer trennen lassen [Abb. 4C und D].

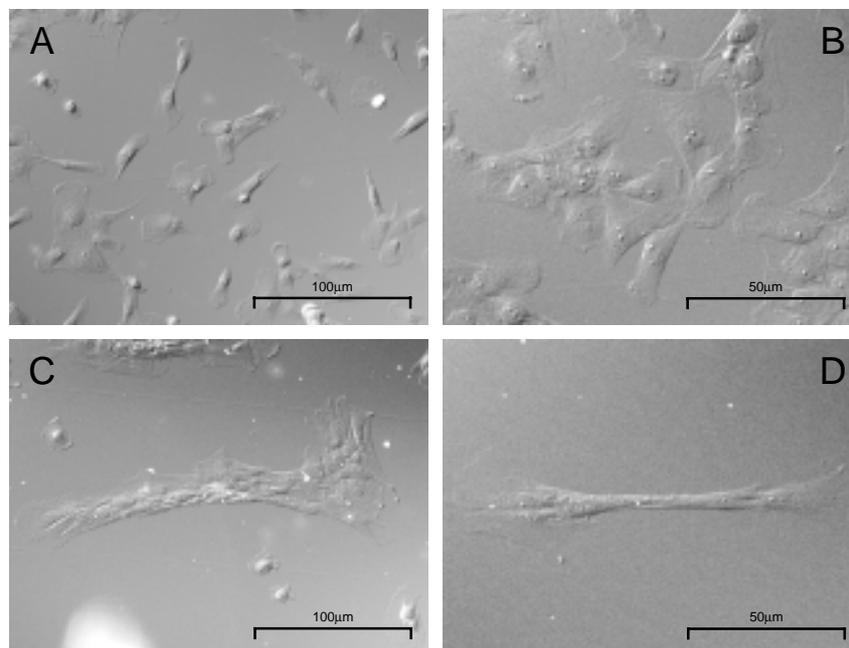


Abb. 4 Phaseninterferenzkontrastaufnahmen verschiedener Passagen kultivierter humaner Chondrocyten. 7A & B: Kulturpassage 2. 7C & D: Kulturpassage 8. 7A & C: Maßstab 100µm, 7B & D: Maßstab = 50µm.

3.1.4 Immunhistologische Untersuchung der kultivierten Chondrocyten auf knorpelspezifische Marker

Der veränderte Habitus der kultivierten Chondrocyten geht mit einer veränderten Immunreaktivität der Zellen gegen verschiedene Matrixprotein-spezifische Antikörper einher; ein Hinweis auf eine parallel stattfindende Veränderung des Differenzierungsgrades der Zellen. Abbildung 5 (S. 23) demonstriert diese veränderte Matrixproteinexpression. Zeigen frühe Chondrocyten-Kulturstadien (Pas-

sage 2) noch eine relativ schwach ausgeprägte Immunreaktion auf Antikörper gegen das bindegewebspezifische Kollagen I im Bereich des Cytoplasmas [Abb. 5A, ↗], so nimmt diese bis Kulturpassage 8 sehr stark zu. Wie hier zu erkennen ist, sind weite Bereiche des Cytoplasmas stark angefärbt [Abb. 5B, ↗]. Anders verhalten sich die Immunfärbungen gegen Kollagen II. Zellen der Kulturpassage 2 weisen hier eine starke Immunreaktion im Cytoplasma auf [Abb. 5C, ↗], die mit zunehmender Passagenzahl stetig abnimmt und in Passage 8 nur noch sehr schwach zu erkennen ist [Abb. 5D, ↗]. Ganz ähnlich zeigt sich das Ergebnis der immuncytologischen Färbung verschiedener Kulturstadien gegen Knorpelproteoglykane. Während Chondrocyten der Passage 2 noch eine deutliche circumnukleäre Immunreaktion aufweisen [Abb. 5E, ↗; PGA], geht diese bis zu Passage 8 ganz verloren [Abb. 5F]. Ohne Sekundärantikörper zeigte sich keine Immunantwort (nicht gezeigt).

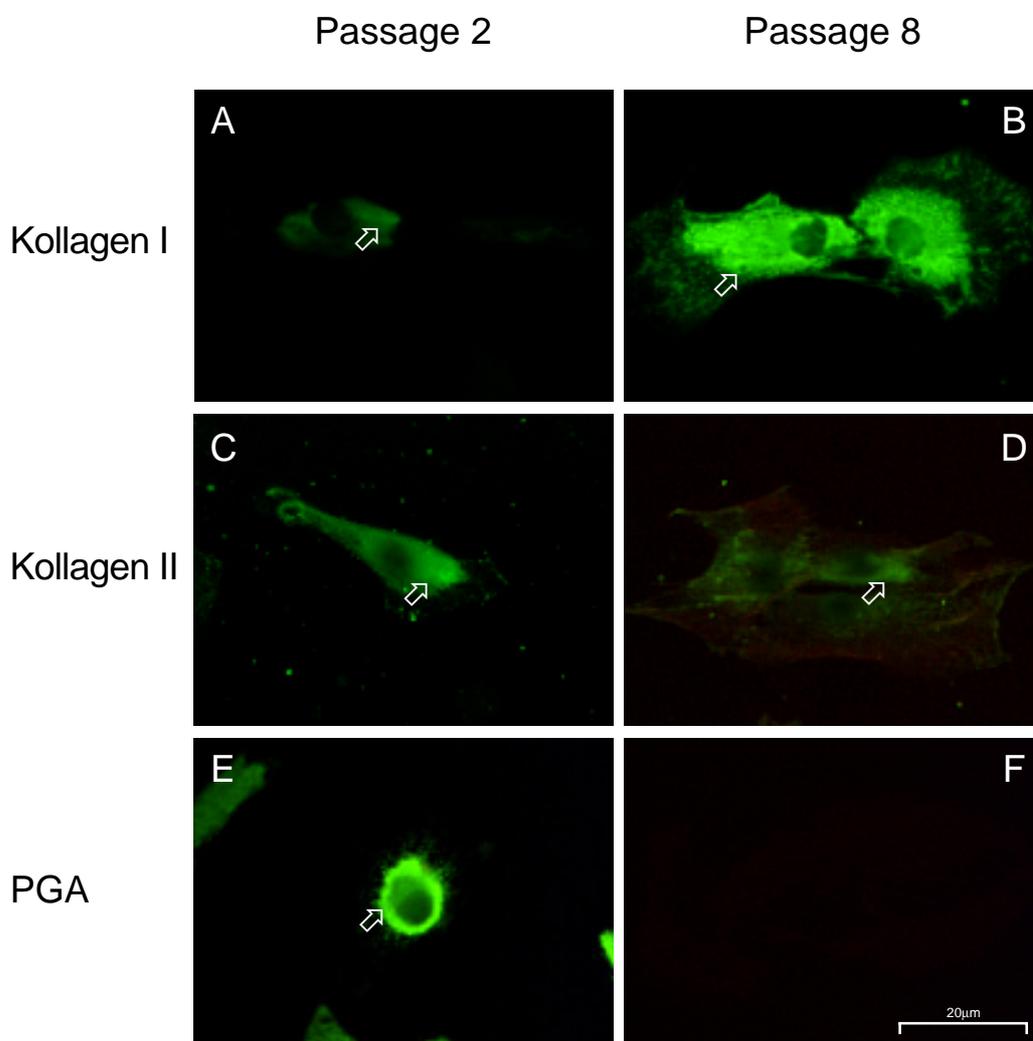


Abb. 5 Immuncytochemischer Nachweis verschiedener Matrixproteine in unterschiedlichen Stadien kultivierter humaner Chondrocyten. ↗ = positive Immunantwort im Cytoplasma. Maßstab = 20µm.

3.2 Analyse des Proliferationsverhaltens kultivierter humaner Chondrocyten

3.2.1 Veränderung der Proliferationsraten mit zunehmender Passagenzahl

Aus den vorherigen Ergebnissen geht hervor, daß mit zunehmender Passagenzahl und der damit einhergehenden Veränderung des Differenzierungsgrades der kultivierten humanen Chondrocyten zugleich eine Veränderung des morphogenetischen Phänotyps mit einer Herunterregulation der knorpel-spezifischen extrazellulären Matrixproteine Kollagen II und Knorpelproteoglykane, sowie eine Hochregulation des eher fibroblastentypischen Kollagen I auf Proteinebene stattfindet.

Da sich eine Zelle nur während eines bestimmten Differenzierungsgrades teilt, und wir als Projektziel Chondrocyten zur Züchtung von Knorpelgewebe kontrolliert zur Proliferation bringen möchten, stellt sich nun die Frage, in welchem Bezug die Proliferationsrate der Zellen zum jeweiligen Differenzierungsgrad - und damit zur Passagenzahl - steht.

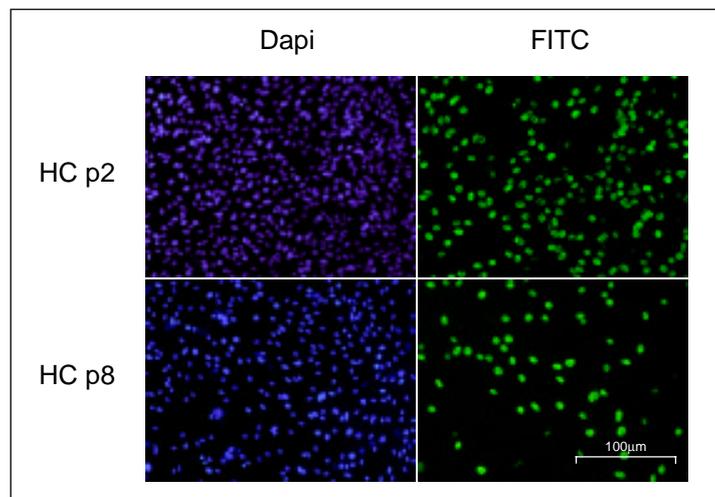


Abb. 6 Exemplarische Darstellung der immunocytochemischen BrdU-Färbung in verschiedenen Passagen im Vergleich zur Gesamtzahl der (Dapi markierten) Zellen. *HC p2 & 8 = Chondrocyten Passage 2 & 8 (10% FCS)*, *Dapi = DNA-Kernmarkierung*, *FITC = Anti-BrdU-Immunfärbung*. Maßstab = 100µm

Das Proliferationsverhalten der Zellen kann indirekt über die Untersuchung des Einbaus von 1,5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) überprüft werden. Proliferierende Zellen, so bauen sie das ihnen angebotene BrdU anstelle normalen Uridins in ihre DNA ein, wo es wiederum durch Antikörper immunocytochemisch nachgewiesen werden kann. Damit lassen sich einfach Proliferationsassays erstellen,

die einen klaren Eindruck über das Proliferationsverhalten einer Kultur vermitteln können. Das Proliferationsverhalten der kultivierten humanen Chondrocyten wurde nach unterschiedlichen Passagen mit Hilfe des BrdU-Proliferationsassays, dessen Funktion zuvor an Hela-Zellen überprüft wurde, untersucht.

Die Analyse von Proliferationsassays (n=12) über zehn Kulturpassagen hinweg zeigt, daß mit zunehmender Passagenzahl die Anzahl positiv BrdU markierter Zellen immer weiter abnimmt. Ausgehend von ursprünglich über 40% positiv BrdU markierter Zellen in Passage 2 fällt dieser Anteil von Passage zu Passage hin exponentiell ab, bis schließlich in Kulturpassage 9 nur noch bei weniger als 5% der kultivierten Zellen eingebautes BrdU nachgewiesen werden kann. Abbildung 6 (S.26) zeigt exemplarisch den Rückgang der immunocytochemisch positiv BrdU markierten Zellkerne von Passage 2 [Abb. 6, FITC; siehe HC p2] zu Passage 8 [Abb. 6, FITC; siehe HC p8]. Den Immunocytochemischen Färbungen verschiedener Kulturpassagen gegenübergestellt ist jeweils die Gesamtzahl der Zellen als Dapi-Kernfärbung [Abb. 6, Dapi].

In Abbildung 7 ist die exponentielle Abnahme der positiv BrdU markierten Zellen zur Verdeutlichung als Schaubild grafisch dargestellt.

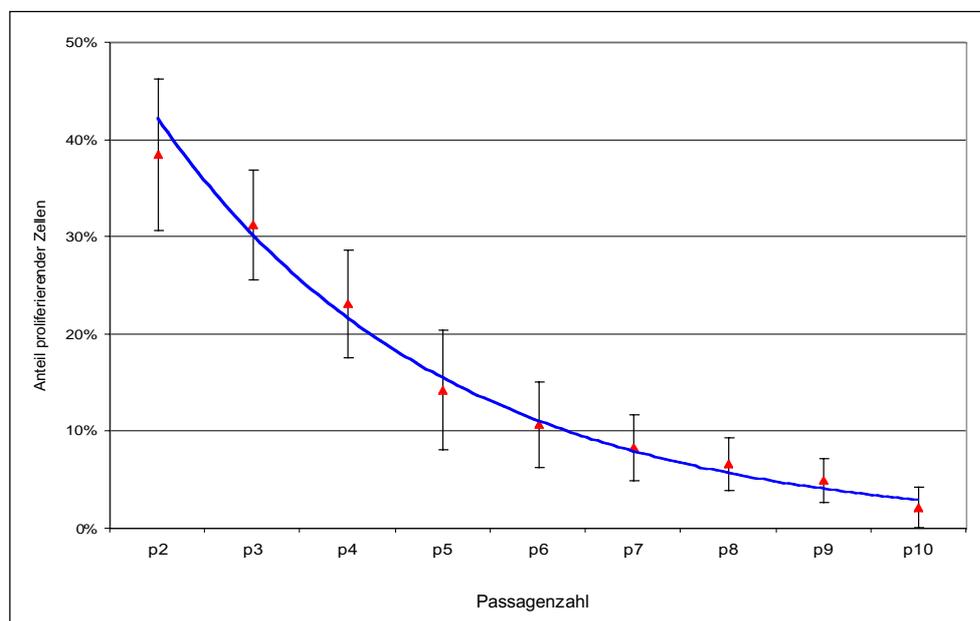


Abb. 7 Rückgang der Proliferationsraten humaner Chondrocyten bei zunehmender Passagenzahl.

Wichtig für die Züchtung von Knorpelgewebe aus kultivierten Zellen ist besonders die maximal zu erhaltende Menge des *in-vitro* kultivierten Zellausgangsmaterials. Ausgehend von einer bei der Dissoziation von 1g frischem Knorpelgewebe erhaltenen Zellzahl von 8×10^4 Zellen lässt sich durch Zählung der Zellen bei jeder Passage eine logarithmische Entwicklung der Gesamtzellzahl bis hin zu 2×10^8 Zellen nachweisen. Dabei wurde die Entwicklung der Gesamtzellzahl bis hin zur fast vollständigen Einstellung der Proliferation über zehn Kulturpassagen hinweg verfolgt (n=12).

Mit zunehmender Passagenzahl wird also sehr schnell eine Sättigung der Gesamtzellzahl erreicht, was offensichtlich auf die parallel nachweisbare abnehmende Proliferationsrate der Zellen zurückzuführen ist. Abbildung 8 zeigt diese Entwicklung grafisch aufbereitet.

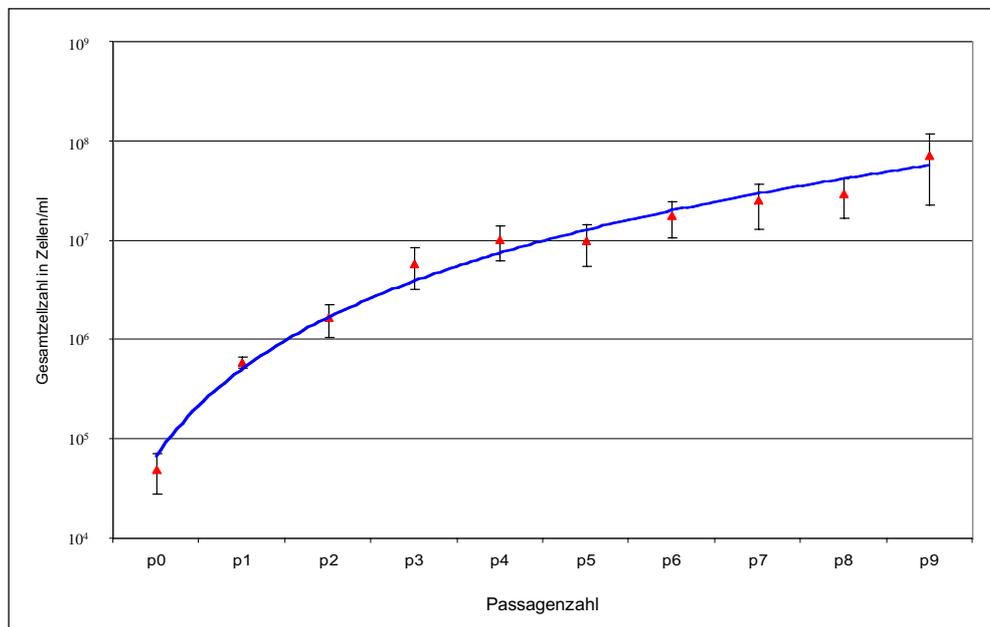


Abb. 8 Entwicklung der in der *in-vitro* Kultur erreichbaren Gesamtzellzahl humaner Chondrocyten in Verhältnis zur Passagenzahl.

3.2.2 Veränderung der Proliferationsraten nach Reduktion der Serummenge

Eine Ursache für die abnehmende Proliferationsrate und schnelle Sättigung der Gesamtzellzahl könnte in einer unzureichenden Versorgung der Zellen mit Serummitogenen sein. So kann das Proliferationsverhalten von kultivierten Zellen tatsächlich oft durch die Gabe oder den Entzug von Serummitogenen mit dem Kulturmedium nachhaltig beeinflusst werden. Im Allgemeinen führt der Entzug von Serummitogenen bei kultivierten Zellen zu einer Einstellung der Proliferation. Wir haben daher überprüft, welchen Einfluß der Entzug von Serum in frühen Kulturpassagen (Passage 2) auf das Proliferationsverhalten kultivierter humaner Chondrocyten ausübt.

Die Reduzierung der Serummenge bei kultivierten humanen Chondrocyten von 10% FCS im Kulturmedium auf 0,1% während Kulturpassage 2 führt zu einem sichtbaren Rückgang der Zahl positiv BrdU markierter Zellen. Von ursprünglich über 40% positiv BrdU markierten Zellen in Passage 2 [Abb. 9, FITC; siehe HC p2] zeigen nach Serumentzug nur noch rund 5% der Zellen positive Kernre-

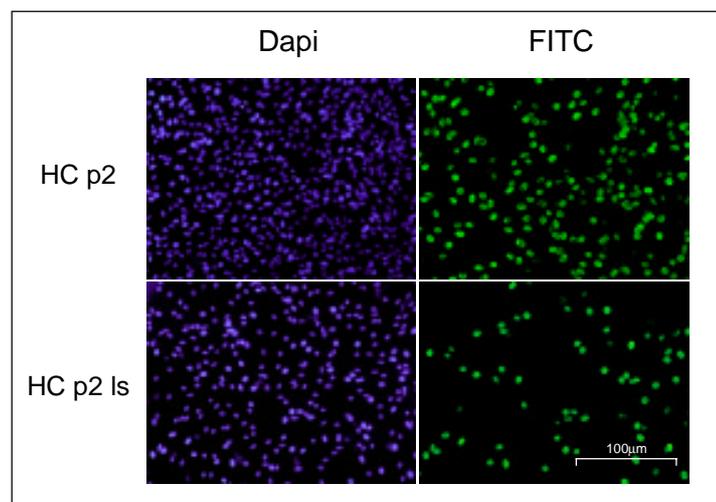


Abb. 9 Exemplarische Darstellung der immuncytochemischen BrdU-Färbung unter unterschiedlichen Kulturbedingungen im Vergleich zur Gesamtzahl der (Dapi markierten) Zellen. *HC p2* = Chondrocyten Passage 2 (10% FCS), *HC p2 ls* = Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS), Dapi = DNA-Kernmarkierung, FITC = Anti-BrdU-Immunfärbung. Maßstab = 100µm

aktionen [Abb. 9, FITC; siehe HC p2 ls]. Den immuncytochemischen Färbungen unter den jeweiligen Kulturbedingungen sind die Gesamtzahlen der Zellen als Dapi-Kernfärbung gegenübergestellt [Abb. 9, Dapi]. Nach Rückführung der Zellen in Medium mit 10% Serum stieg die Zahl proliferierender Zellen auf rund 95% des präquieszenten Zustands (Daten nicht gezeigt).

Um fehlerhafte Auswertungen durch bereits abgestorbene Zellen zu vermeiden, deren DNA-Fragmente bei der Dapi-Färbung jedoch noch positive Signale liefern würden, wurde die Vitalität der Zellen, wie in Kapitel 2 beschrieben, mit Hilfe des Live-Dead® Viability/Cytotoxicity Kits No L 3224 der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) überprüft. Es konnte keine Zunahme an abgestorbenen Zellen während der Reduktion der Serummenge auf 0,1% beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, daß sowohl durch die zunehmende Passagierung der Zellen ein Rückgang der Proliferation erzielt werden kann, als auch durch Serumentzug. Im Gegensatz zum Rückgang der Proliferation nach andauernder Subkultivierung der Zellen ist der Rückgang der Proliferation nach Serumentzug jedoch reversibel und deutet damit auf einen Serummitogen-induzierten quieszenten Zustand hin.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse des ersten Projektabschnittes, daß die Expression der extrazellulären Matrixproteine sich in Abhängigkeit vom Proliferations- und Differenzierungsgrad der Chondrocyten ändert. Die im differenzierten Zustand der Chondrocyten hohe Expression knorpeltypischer Matrixproteine, wie z.B. Kollagen II und Knorpelproteoglykane (PGA) geht mit zunehmender Passagendauer zugunsten einer eher bindegewebstypischen Expression von Kollagen I zurück. Damit einher geht eine differenzierungsgradabhängige, sukzessive Veränderung des Habitus der Zellen von einem polygonalen, zu einem fibroblastenartigen, längs gestreckten Aussehen.

Gemeinsam mit dem Differenzierungsgrad der kultivierten humanen Chondrocyten ändert sich außerdem deren Proliferationsverhalten. Anfängliche Proliferationsraten von über 40% (Passage 2) erfahren dabei einen Rückgang auf unter 5% ab Passage 8.

Das Proliferationsverhalten der kultivierten humanen Chondrocyten läßt sich zudem künstlich durch den Entzug von Serummitogenen in Passage 2 auf unter 5% absenken. Dieser künstlich erzeugte Proliferationsstop durch Serumentzug ist im Gegensatz zur altersbedingten Einstellung der Proliferation ein reversibler Prozeß.

3.3 Immunhistochemische Identifizierung von Zellzyklusregulatoren in humanem Knorpelgewebe

Nach der Identifizierung von zellulären Markern und der Beschreibung distinkter Differenzierungsprozesse von Knorpelgewebe am Beispiel humaner Nasensepten, folgt jetzt die Identifizierung verschiedener Zellzyklusregulatoren in humanem Knorpelgewebe.

Dazu wurde humanes Nasenseptumgewebe, das als Biopsiematerial während *Septumplastiken* anfiel, als Beispiel für ein typisches Knorpelgewebe auf diejenigen Zellzyklusregulatoren untersucht, die möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des G1/S-Phasen Übergangs spielen. Die Spezifität der Antikörper wurde anhand von Kontrollgeweben verifiziert, in denen bereits eine positive Expression dieser Regulatoren in der Literatur beschrieben wurde. Die lymphatischen Sekundärfollikel der *Tonsilla palatina* (Gaumenmandel), des Organs, dessen bindegewebige Teile zuvor schon als Kontrollgewebe verwendet wurden (Kap. 3.1) sind durch die bereits in der Literatur beschriebene Detektion von Zellzyklusregulatoren auch in diesem Fall als Kontrollgewebe geeignet.

INK4-Familie

Als Mitglieder der INK4-Familie wurden die Proteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} untersucht. Abbildung 10 (S.31) zeigt den immunhistologischen Nachweis dieser Proteine in humanem Nasenseptumgewebe [Abb. 10A] und humanem Tonsillargewebe [Abb. 10B]. Für alle vier Mitglieder der INK4-Familie ist eine positive Immunantwort in beiden Geweben erkennbar, die ausschließlich auf die Zellkerne (Pfeile) beschränkt bleibt. Die positive Immunreaktion für alle Zellzyklusregulatoren in Tonsillengewebe [Abb. 10B] unterstreicht die Spezifität der Antikörper.

Im Vergleich zwischen Nasenseptum- und Tonsillengewebe zeigt sich, daß die Stärke der Immunantwort in Tonsillengewebe im Allgemeinen geringfügig stärker ausgeprägt ist.

CIP/KIP-Familie

Auch für die Mitglieder der CIP/KIP-Familie (p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}) ergibt sich ein ähnliches Bild. Alle drei Mitglieder der Familie können eindeutig in den Kernen der lymphatischen Sekundärfollikel des humanen Tonsillengewebes nachgewiesen werden [Abb. 11B; S.32]. Dies verdeutlicht die Spezifität der Antikörper.

Auch für die Expression der einzelnen Regulatoren in humanem Nasenseptumgewebe ergibt sich ein allgemein positiver Nachweis ausschließlich in den Zellkernen. Während hier eine etwas geringere Immunfärbung gegen p27^{KIP1} beobachtet werden kann [Abb. 11A, p27^{KIP1}] als in den lymphatischen Sekundärfollikeln [Abb. 11B, p27^{KIP1}], ist die Immunantwort für p57^{KIP2} in den Zellkernen des Septengewebes [Abb. 11A, p57^{KIP2}] etwas stärker ausgeprägt als in den Kernen des Tonsillengewebes [Abb. 11B, p57^{KIP2}].

Rb-Familie

Ein positiver Nachweis der Expression der Mitglieder der Rb-Protein Familie (p107, p130 und pRb) kann in den Zellkernen des humanen Nasenseptumgewebes erbracht werden. Für jedes der Mitglieder der Rb-Familie ist in den Knorpelzellen eine positive Kernreaktion beobachtet worden [Abb. 12A; S. 33].

CDK-Familie

Von den neun zur Zeit bekannten Zyklinabhängigen-Kinasen wurden nur CDK2, CDK4 und CDK6 untersucht, die alle bei der Regulation des G1-S-Phasen-Übergangs eine Rolle zu spielen scheinen. Die in Abbildung 13B (S. 34) gezeigten Kernreaktionen im humanen Tonsillengewebe nach Färbungen mit Antikörpern gegen die Mitglieder der CDK-Familie weisen auf die Spezifität der verwendeten Antikörper hin.

Für alle untersuchten Mitglieder der CDK-Familie kann auch eine positive Expression in den Kernen des humanem Nasenseptumgewebes gezeigt werden [Abb. 13A].

Zyklin-Familie

Als Mitglieder der Zyklin-Familie wurde die drei maßgeblich an der G1-Regulation beteiligten Zykline (Zyklin A, Zyklin D1 und Zyklin E) untersucht.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen diese drei Zykline wird durch eine positive Kernreaktion in den lymphatischen Sekundärfollikeln des humanen Tonsillengewebe unterstrichen [Abb. 14B; S. 35].

Abbildung 14A zeigt die positiven Immunreaktionen in den Zellkernen des humanen Nasenseptumgewebes für alle drei untersuchten Mitglieder der Zyklin-Familie.

Bei Abwesenheit der Primärantikörper zeigt sich eine negative Immunantwort bei allen Experimenten. Exemplarisch ist dies in Abbildung 14 für humanes Nasenseptumgewebe [Abb. 14A, Kontrolle] und humanes Tonsillengewebe [Abb. 14B, Kontrolle] gezeigt.

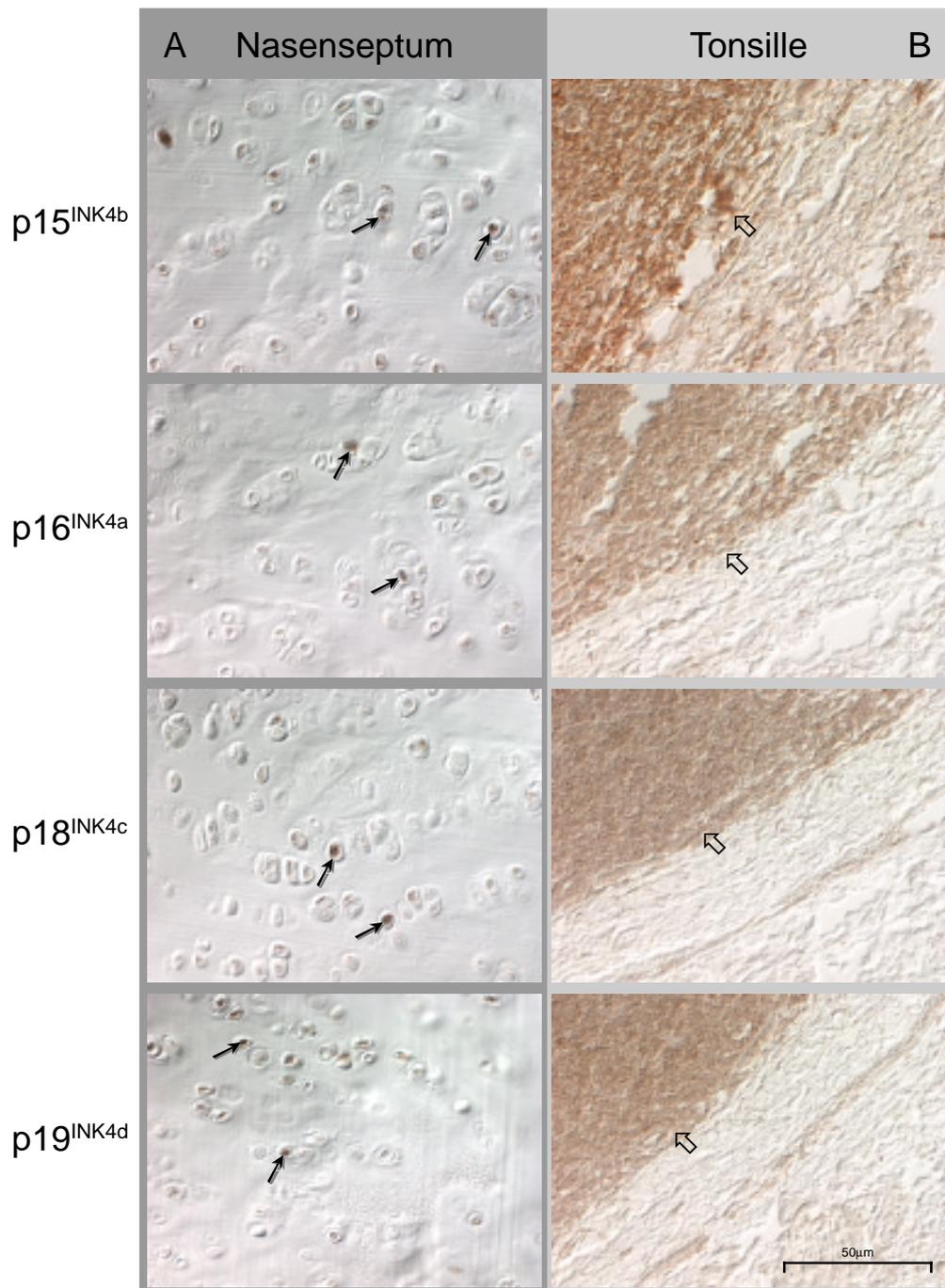


Abb. 10 Immunhistologischer Nachweis der Proteine der INK4-Familie in humanem Knorpel und in humanem Tonsillengewebe. \blacktriangleright = positive Kernreaktion in Knorpel, \blacktriangleright = positive Immunantwort in lymphatischen Sekundärfollikeln. Maßstab = 50µm.

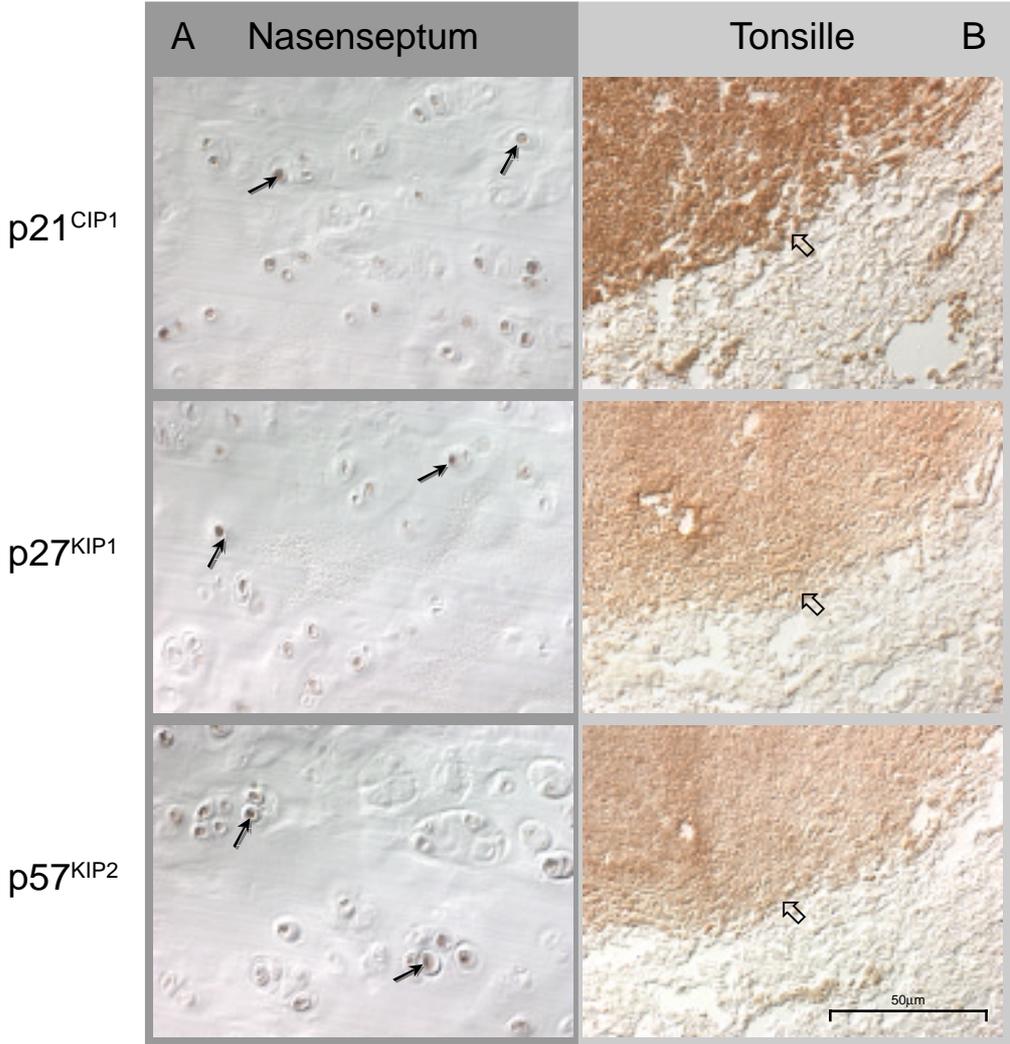


Abb. 11 Immunhistologischer Nachweis der Proteine CIP/KIP-Familie in humanem Knorpel und in humanem Tonsillengewebe. ↗ = positive Kernreaktion in Knorpel, ↘ = positive Immunantwort in lymphatischen Sekundärfollikeln. Maßstab = 50µm.

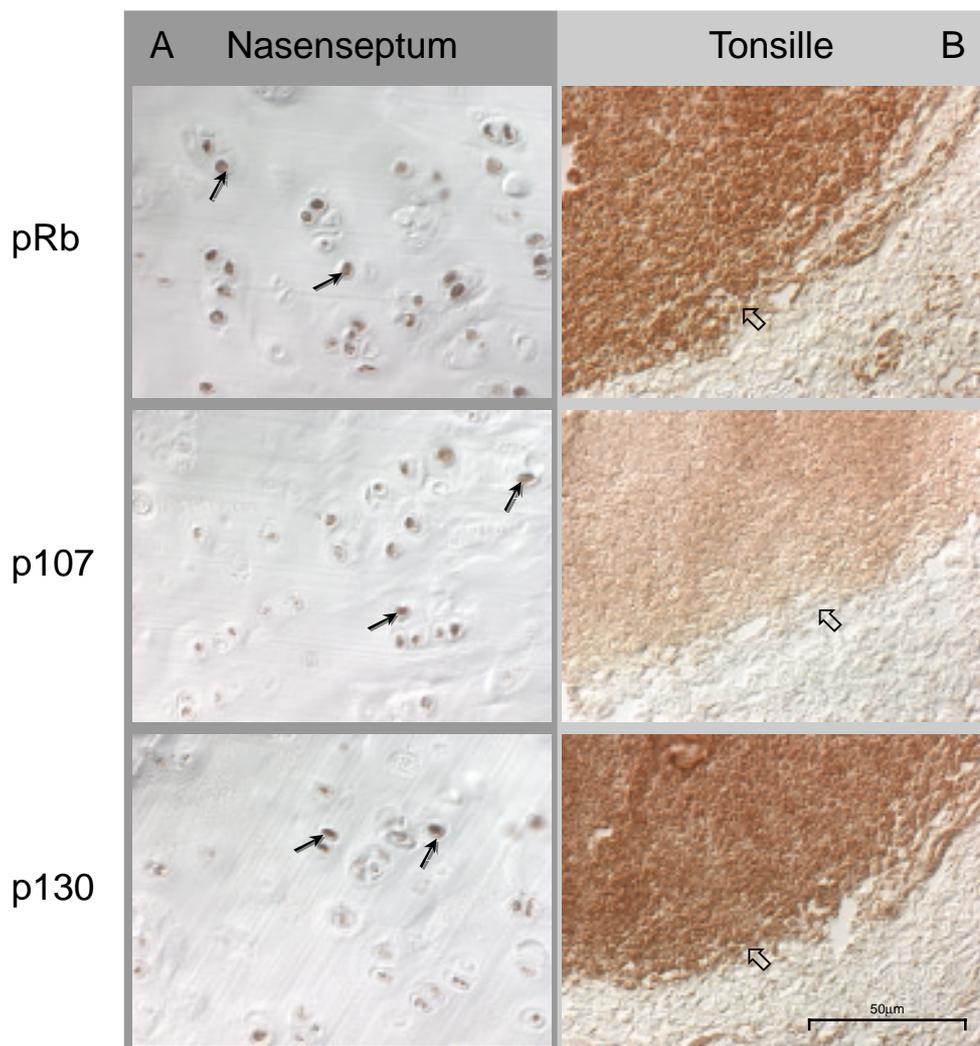


Abb. 12 Immunhistologischer Nachweis der Proteine Rb-Familie in humanem Knorpel und in humanem Tonsillengewebe. \blacktriangleright = positive Kernreaktion in Knorpel, \blacktriangleright = positive Immunantwort in lymphatischen Sekundärfollikeln. Maßstab = 50µm.

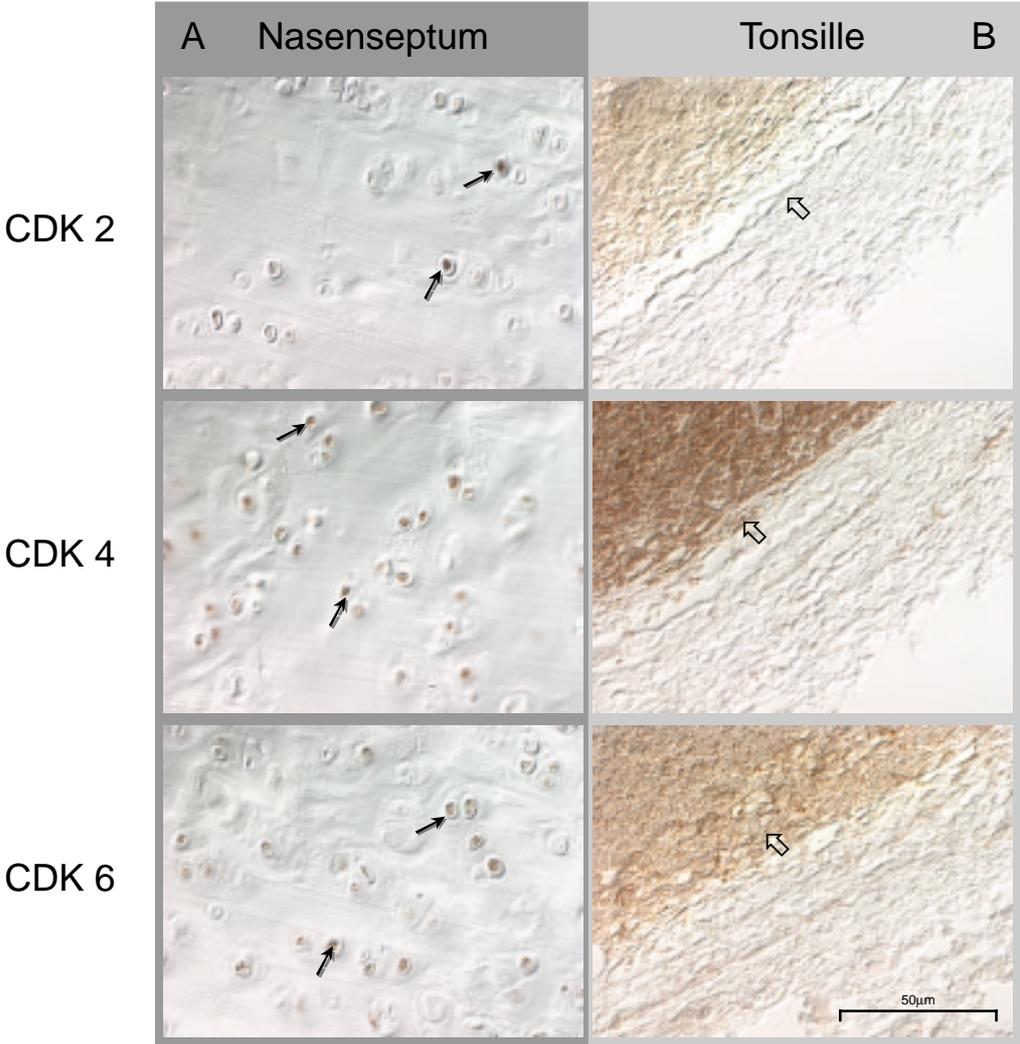


Abb. 13 Immunhistologischer Nachweis der Proteine CDK-Familie in humanem Knorpel und in humanem Tonsillengewebe. ↗ = positive Kernreaktion in Knorpel, ↖ = positive Immunantwort in lymphatischen Sekundärfollikeln. Maßstab = 50µm.

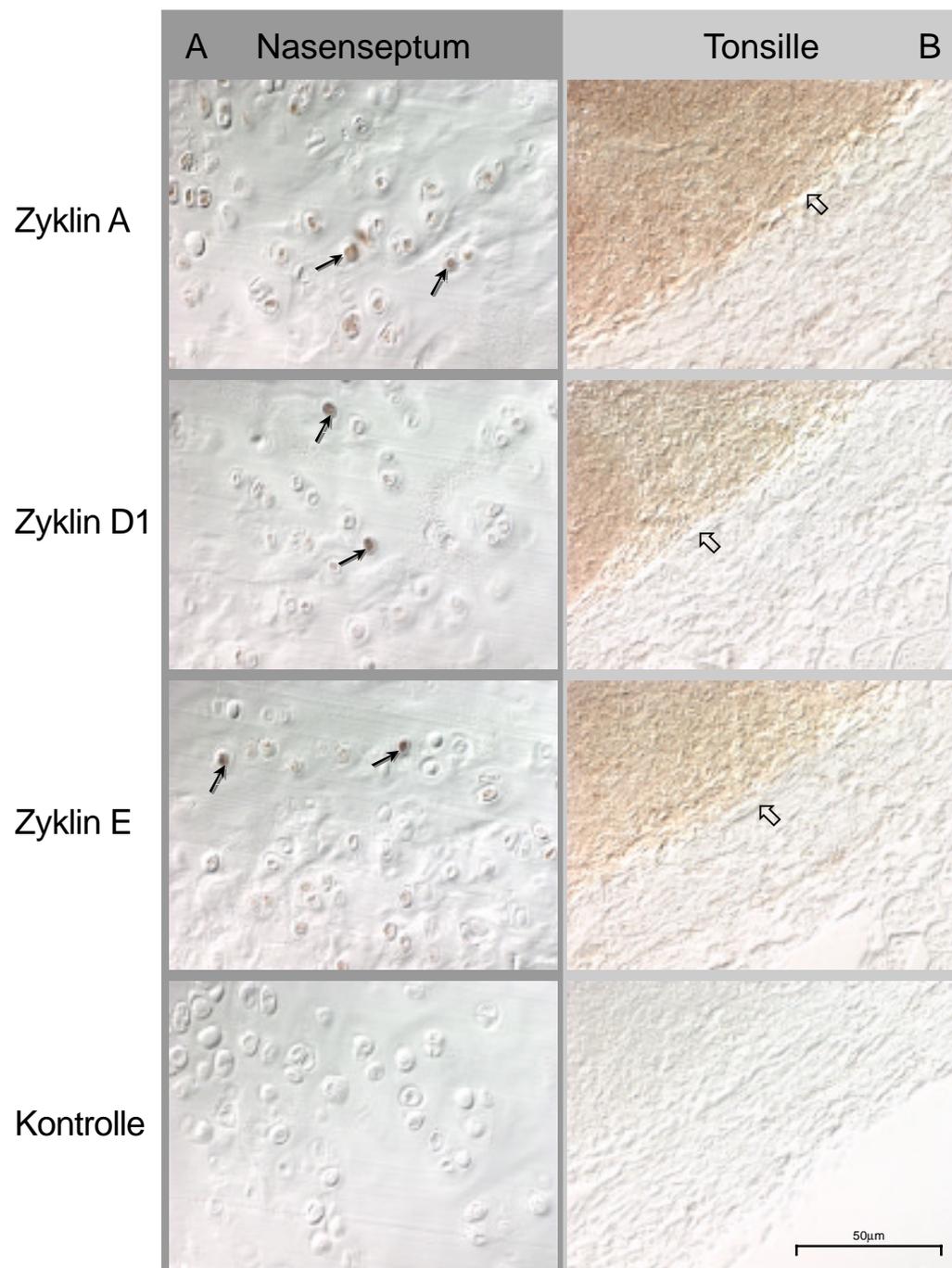


Abb. 14 Immunhistologischer Nachweis der Proteine Zyklin-Familie in humanem Knorpel und in humanem Tonsillengewebe, sowie Darstellung der Spezifität des Sekundärantikörpers. ↗ = positive Kernreaktion in Knorpel, ↗ = positive Immunantwort in lymphatischen Sekundärfollikeln. Maßstab = 50µm.

Zusammenfassend konnte in den Analysen der Expression aller untersuchter Zellzyklusregulatoren auf Proteinebene ein positiver Expressionsnachweis in den Zellkernen der adulten Nasenseptumgewebszellen erbracht werden, die als Beispiel für ausdifferenzierte Knorpelzellen verwendet wurden.

3.4 Identifizierung von Zellzyklusregulatoren in humanen Chondrocyten in verschiedenen Kulturpassagen und Kulturbedingungen

3.4.1 Immunhistochemie

Nachdem die Expression der unterschiedlichen Zellzyklusregulatorproteine in adultem ausdifferenziertem humanem Nasenseptumgewebe nachgewiesen wurde, sollte weiterhin die Expression dieser Regulatoren in kultivierten humanen Chondrocyten, insbesondere in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kulturpassagen und Kulturbedingungen untersucht werden. In einem ersten Ansatz wurde dazu die Expression der unterschiedlichen Zellzyklusregulatorproteine mit Hilfe von subtypspezifischen Antikörpern untersucht. Als Positivkontrolle dienten hierbei Hela-Zellen in denen die Expression von Zellzyklusregulatoren bereits sowohl auf Protein als auch auf RNA-Basis beschrieben ist [Abb. 15 - 20A; S. 40-45]. Im Vergleich dazu wurde die Expression dieser Regulatoren in unterschiedlichen Kulturpassagen und unterschiedlichen Kulturbedingungen in humanen Chondrocyten untersucht, die aus humanen Nasensepten isoliert wurden [Abb. 15 - 20B].

Für eine eventuelle spätere Manipulation der Proliferation kultivierter Chondrocyten ist besonders die Kenntnis einer sich möglicherweise im Verlauf der Kultivierung und damit in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, oder durch Serumentzug ändernde Expressionsrate eines Zellzyklusregulators interessant, da dieser eine Rolle bei der Änderung des Proliferationsverhaltens durch Subkultivierung und Passagierung, oder durch Serumentzug spielen könnte. Daher konzentrierte sich die immunocytochemische Protein-Expressionsanalyse insbesondere auf die Analyse einer veränderten Expression eines distinkten Zellzyklusregulators über die Dauer der Passagen oder in Abhängigkeit von Serumentzug.

Neben der altersbedingten nicht reversiblen Einstellung der Proliferation (Seneszenz) in späteren Kulturstadien (Passage 8 = p8) wurde aus diesem Grund auch der durch Serummitogenmangel verursachte, reversible Proliferationsstopp (Quieszenz, siehe Kap. 3.2.2) in frühen Kulturstadien (Passage 2, low serum = p2 ls) parallel zu einem mittlerem Kulturstadium (Passage 4 = p4) zur Analyse ausgewählt.

INK4-Familie

Abbildung 15B (S. 40) zeigt den immunocytochemischen Nachweis der Proteine der INK4-Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) in humanen Chondrocyten in den Kulturstadien Passage 2 bis Passage 8, sowie in Passage 2 nach Serumentzug.

Für p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p18^{INK4c} ergibt zeigt sich eine kontinuierliche Verstärkung der Immunantwort von frühen zu späten Kulturpassagen hin [Abb. 15B, p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p18^{INK4c}; siehe HC p2, p4 und p8]. Bei p15^{INK4b} und p18^{INK4c} kommt es darüber hinaus zu einer Verstärkung der Immunantwort nach Entzug der Serummitogene in Kulturpassage 2 [Abb. 15B, p15^{INK4b} und p18^{INK4c}; vergleiche HC p2 und p2 ls].

Bei p16^{INK4a} ist die Immunreaktion nach Serumentzug nicht als stärker zu beurteilen, als in der selben Passage unter Normalbedingungen [Abb. 15B, p16^{INK4a}; vergleiche HC p2 und p2 ls].

Die Immunfärbungen von p19^{INK4d} zeigen dagegen nur eine geringe Zunahme von frühen zu mittleren Kulturpassagen hin [Abb. 15B, p19^{INK4d}; siehe HC p2 und p4]. Die Intensität der Färbungen nimmt weder in späteren Kulturpassagen weiter zu [Abb. 15B, p19^{INK4d}; vergleiche HC p4 und p8], noch zeigen sich Unterschiede zwischen Kulturen früher Passagen unter Normal- bzw. reduzierten Serum-Bedingungen [Abb. 15B, p19^{INK4d}; vergleiche HC p2 und p2 ls].

CIP/KIP-Familie

Als Mitglieder der CIP/KIP-Familie wurden p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} untersucht.

Für p21^{CIP1/WAF1} und p27^{KIP1} können keine signifikanten Veränderungen der Stärke der Immunfärbungen über die unterschiedlichen Kulturpassagen hinweg beobachtet werden [Abb. 16B, p21^{CIP1/WAF1} und p27^{KIP1}; siehe HC p2, p4 und p8; S. 41]. Nach Entzug der Serummitogene in Passage 2 nimmt die Stärke der Immunantwort für p27^{KIP1} gegenüber Normalbedingungen nur kaum sichtbar zu [Abb. 16B, p27^{KIP1}; vergleiche HC p2 und p2 ls]. p57^{KIP2} ist in Passage 2 kaum zu detektieren [Abb. 16B, p57^{KIP2}; siehe HC p2]. Mit Passage 4 nimmt die Expression jedoch erheblich zu [Abb. 16B, p57^{KIP2}; siehe HC p4]. In Passage 8 bleibt die Stärke der Immunantwort auf demselben Niveau wie in Passage 4 [Abb. 16B, p57^{KIP2}; siehe HC p8]. Nach Reduktion der Serummitogene in Passage 2 kommt es zu einer Verstärkung des Signals der Immunreaktion gegenüber unter Normalbedingungen kultivierten humanen Chondrocyten [Abb. 16B, p57^{KIP2}; vergleiche HC p2 und p2 ls].

Rb-Familie

Bei der Untersuchung der Mitglieder der Rb-Familie (pRb, p107, p130) können keine signifikanten Veränderungen in der Stärke der Immunreaktionen unterschieden werden. Wie auf Abbildung 17 (S. 42) zu erkennen, bleiben sowohl über die unterschiedlichen Kulturpassagen hinweg als auch nach Entzug der Serummitogene die Immunantworten auf Antikörper gegen das Retinoblastom-Protein pRb, p107 und p130 gleich [Abb. 17B].

CDK-Familie

Als Mitglieder der CDK-Familie wurden nur die Zyklinabhängigen-Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6 untersucht, die vermutlich bei der Regulation des Übertritts in die S-Phase eine Rolle spielen.

Für alle drei Zyklinabhängigen-Kinasen zeigt sich ein vergleichbares Bild wie für die drei Mitglieder der Rb-Familie. Die Expressionsrate läßt sich weder durch eine andauernde Subkultivierung, noch durch den Entzug von Serummitogenen sichtbar beeinflussen. Es bleibt zu klären, ob die leicht abnehmende Expressionsrate von CDK 6 bei Serumentzug [Abb. 18B, CDK6; vergleiche HC p2 und p2 ls; S. 43] signifikant ist.

Zyklin-Familie

Die Immunreaktionen nach Färbungen mit Antikörpern gegen die drei an der G1-S-Phasen Regulation beteiligten Mitglieder Familie der Zykline (Zyklin A, Zyklin D1, Zyklin E) in Abbildung 19 (S. 44) zeigen über die gesamte Kulturdauer, sowie nach Veränderung der Kulturbedingungen kaum ändernde Intensität der Kernreaktionen [Abb. 19B].

Bei Abwesenheit der Primärantikörper zeigte sich in allen Experimenten eine negative Immunantwort. Dies ist in Abbildung 20 (S. 45) gezeigt.

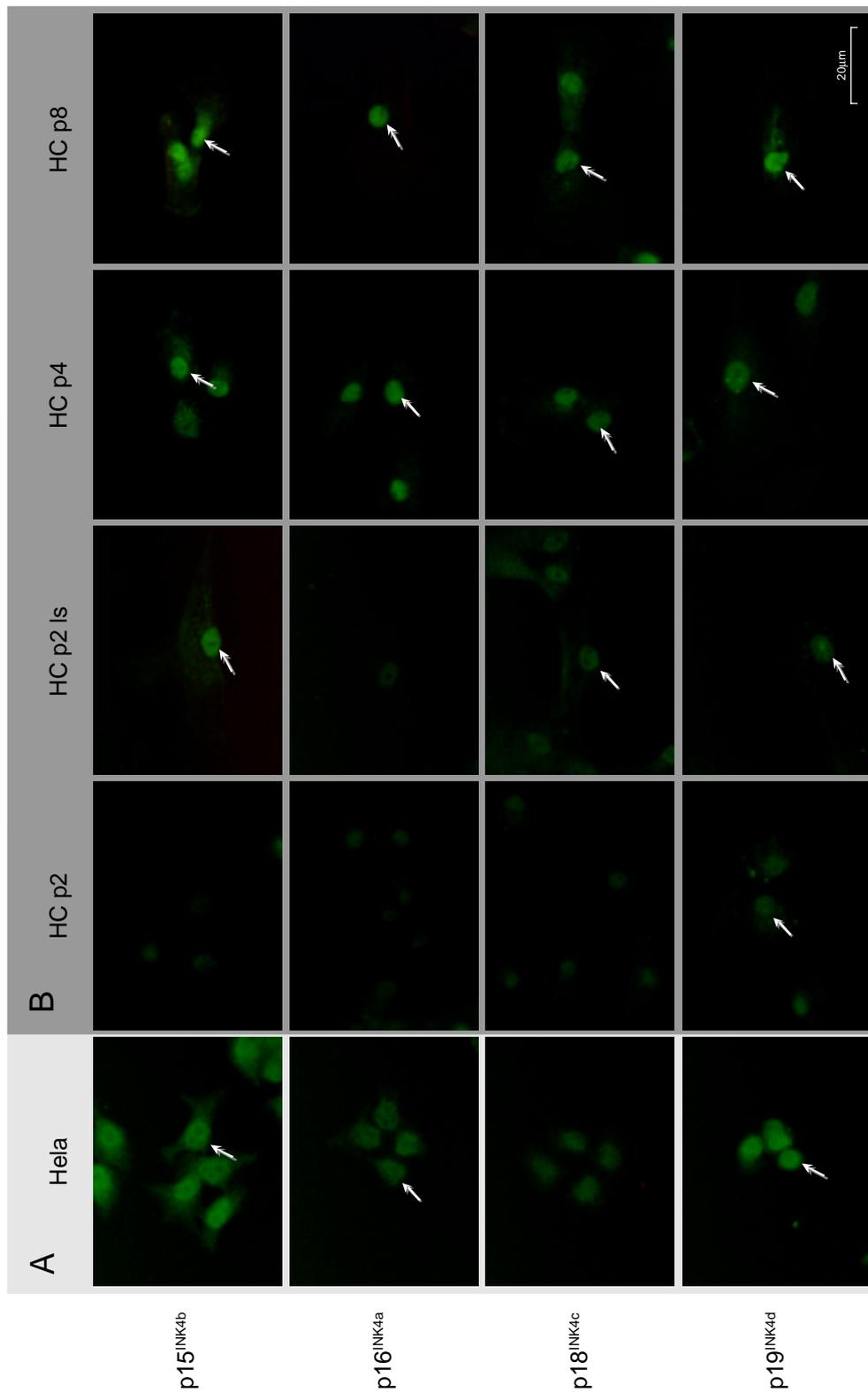


Abb. 15 Immuncytochemischer Nachweis der Proteine der INK4-Familie in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *HeLa* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 ls* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS), \uparrow = positive Kernreaktion. Maßstab = 20 μm.

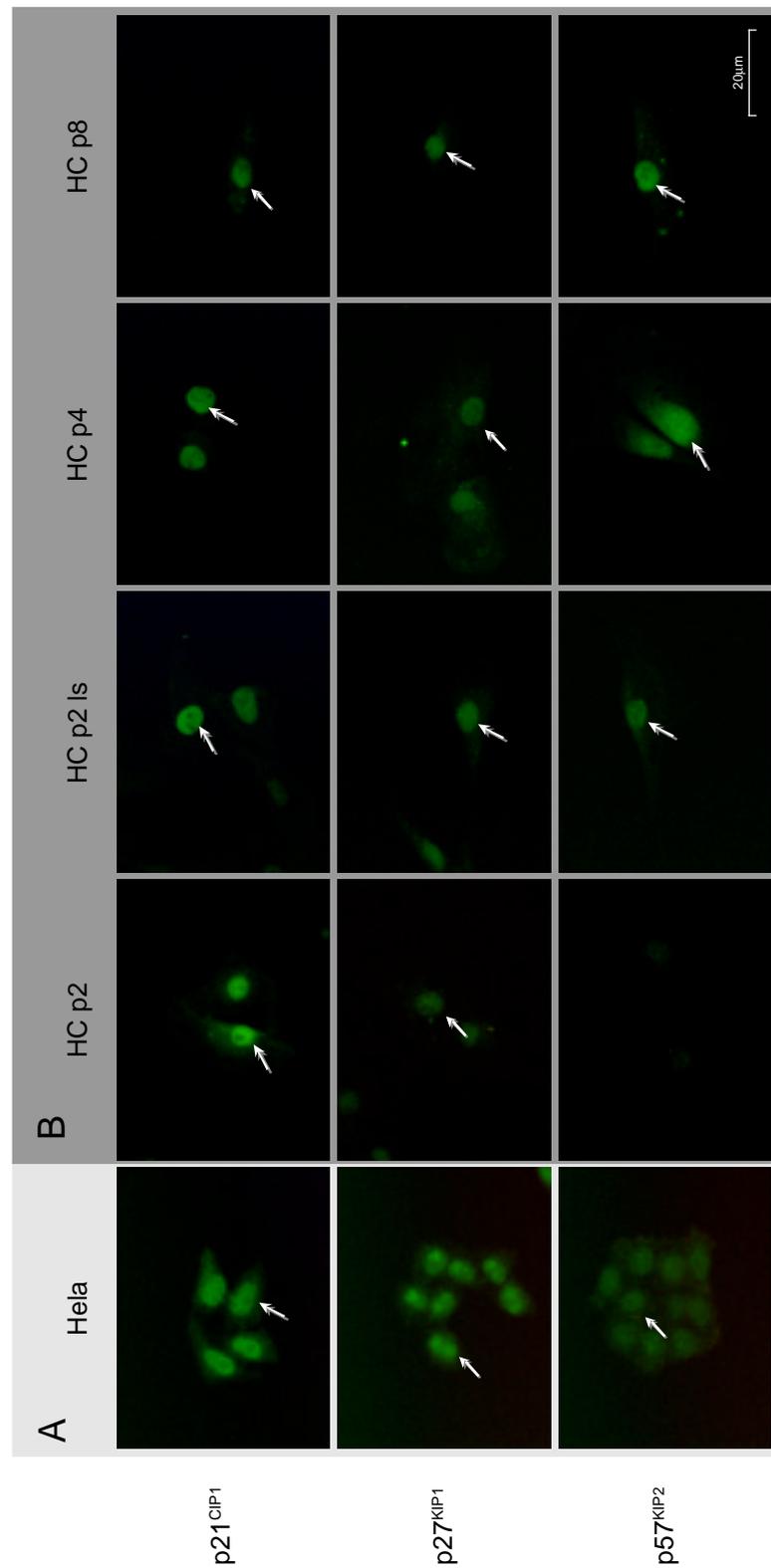


Abb. 16 Immuncytochemischer Nachweis der Proteine der CIP/KIP-Familie in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *HeLa* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 Is* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS), \uparrow = positive Kernreaktion. Maßstab = 20μm.

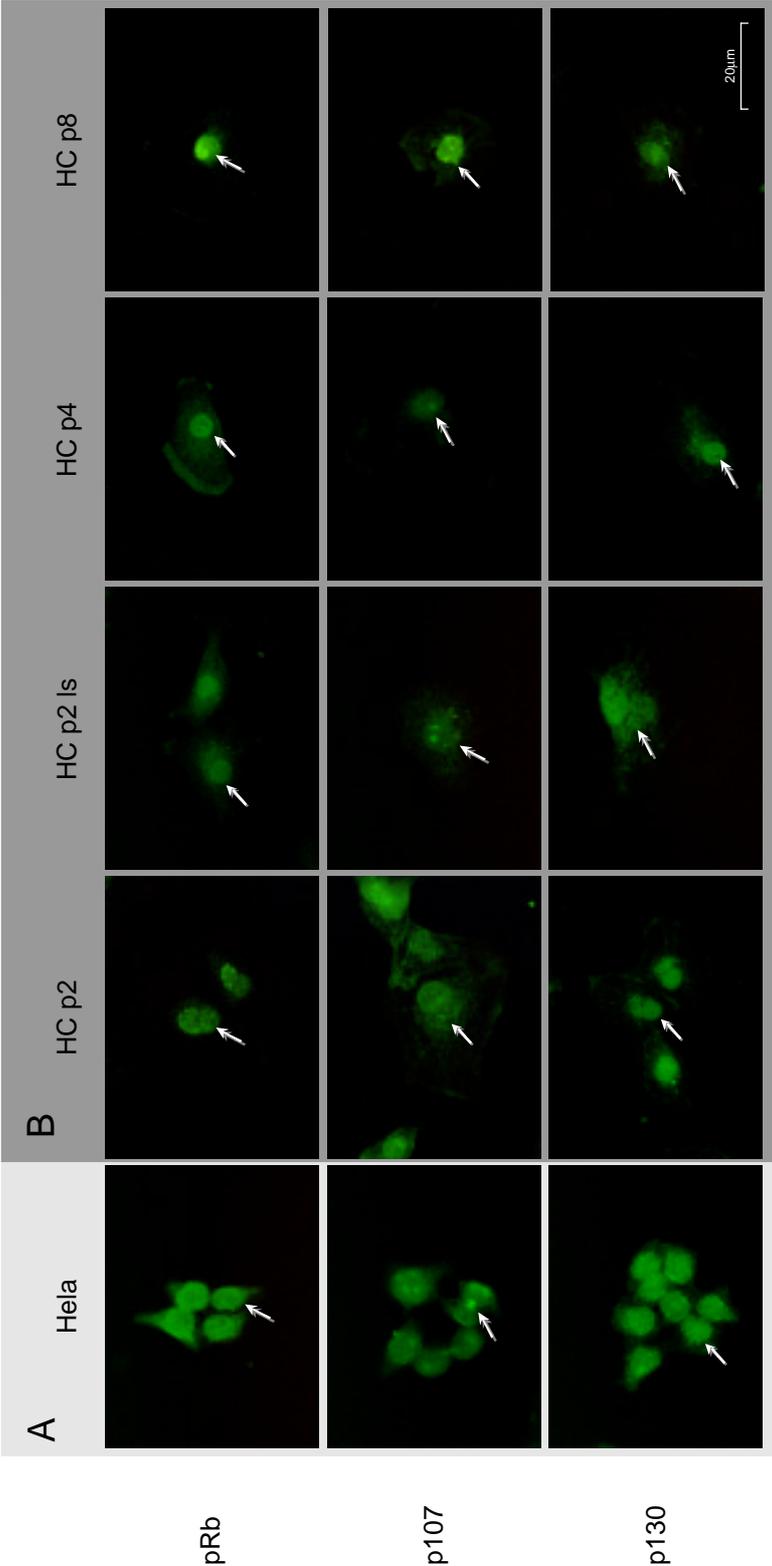


Abb. 17 Immuncytochemischer Nachweis der Proteine der Rb-Familie in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *HeLa* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 ls* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS), \uparrow = positive Kernreaktion. Maßstab = 20µm.

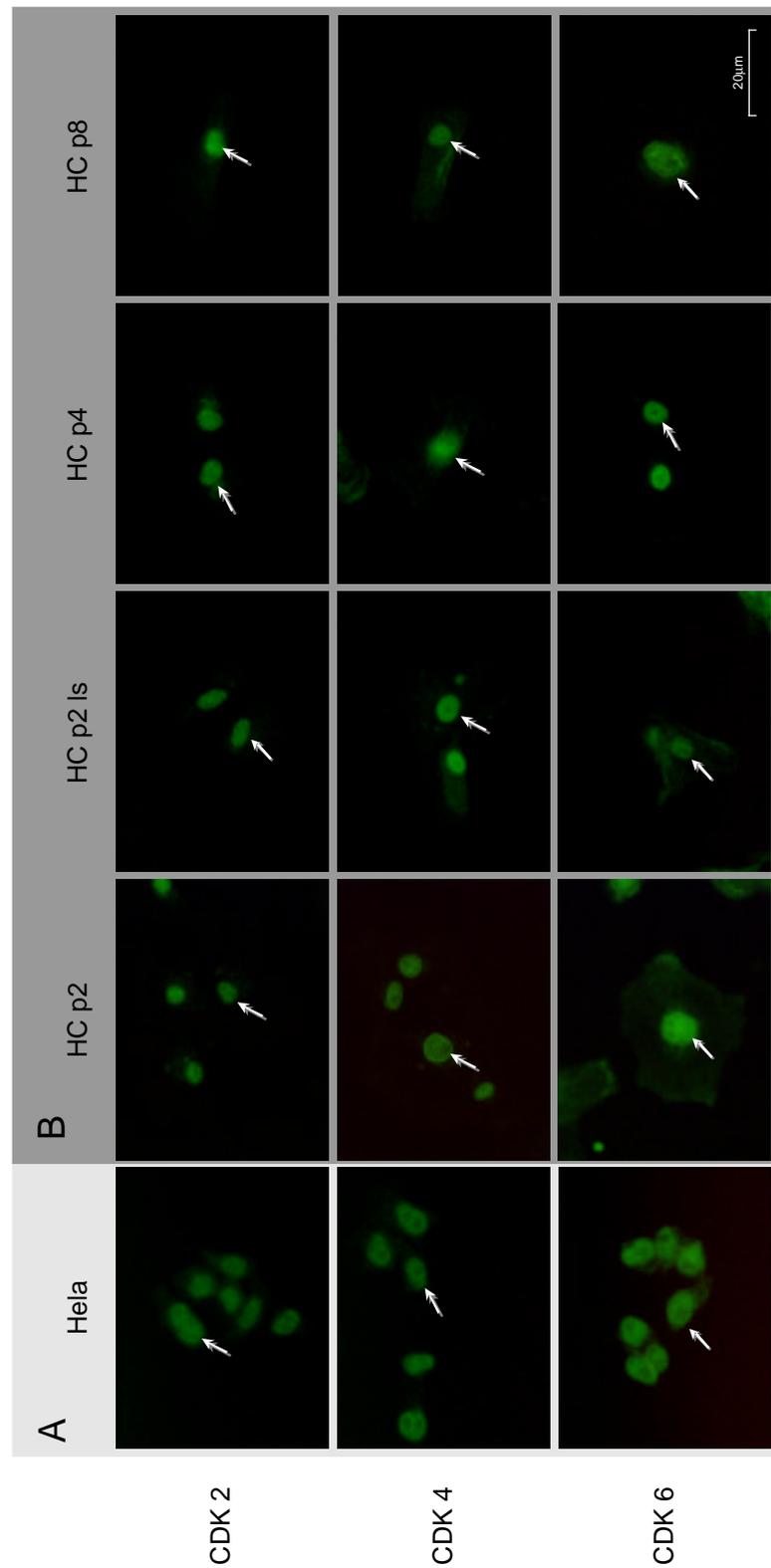


Abb. 18 Immuncytochemischer Nachweis der Proteine der CDK-Familie in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *HeLa* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 Is* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS), † = positive Kernreaktion. Maßstab = 20μm.

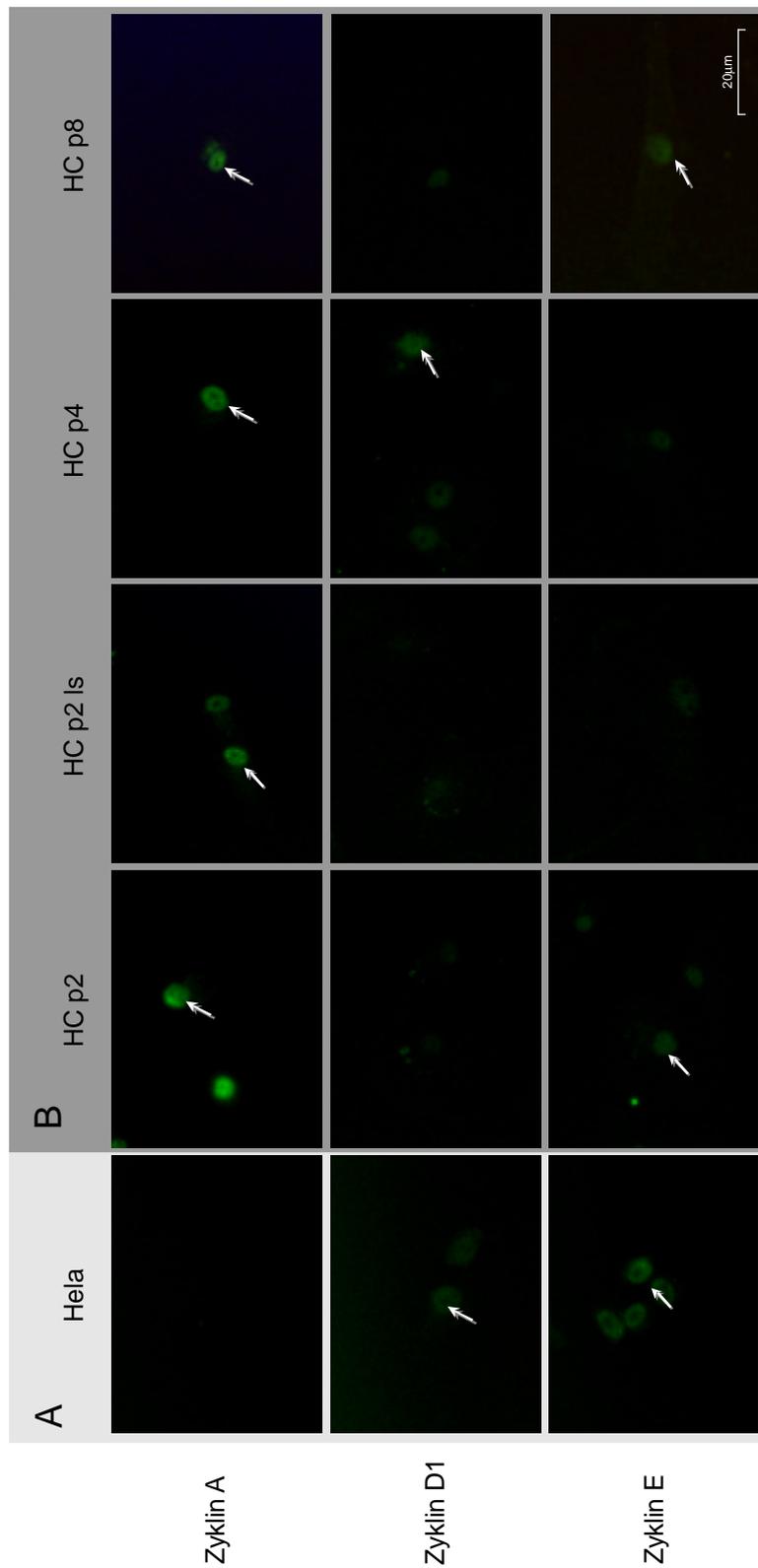


Abb. 19 Immuncytochemischer Nachweis der Proteine der Zyklin-Familie in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *Hela* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 ls* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS), \uparrow = positive Kernreaktion. Maßstab = 20µm.

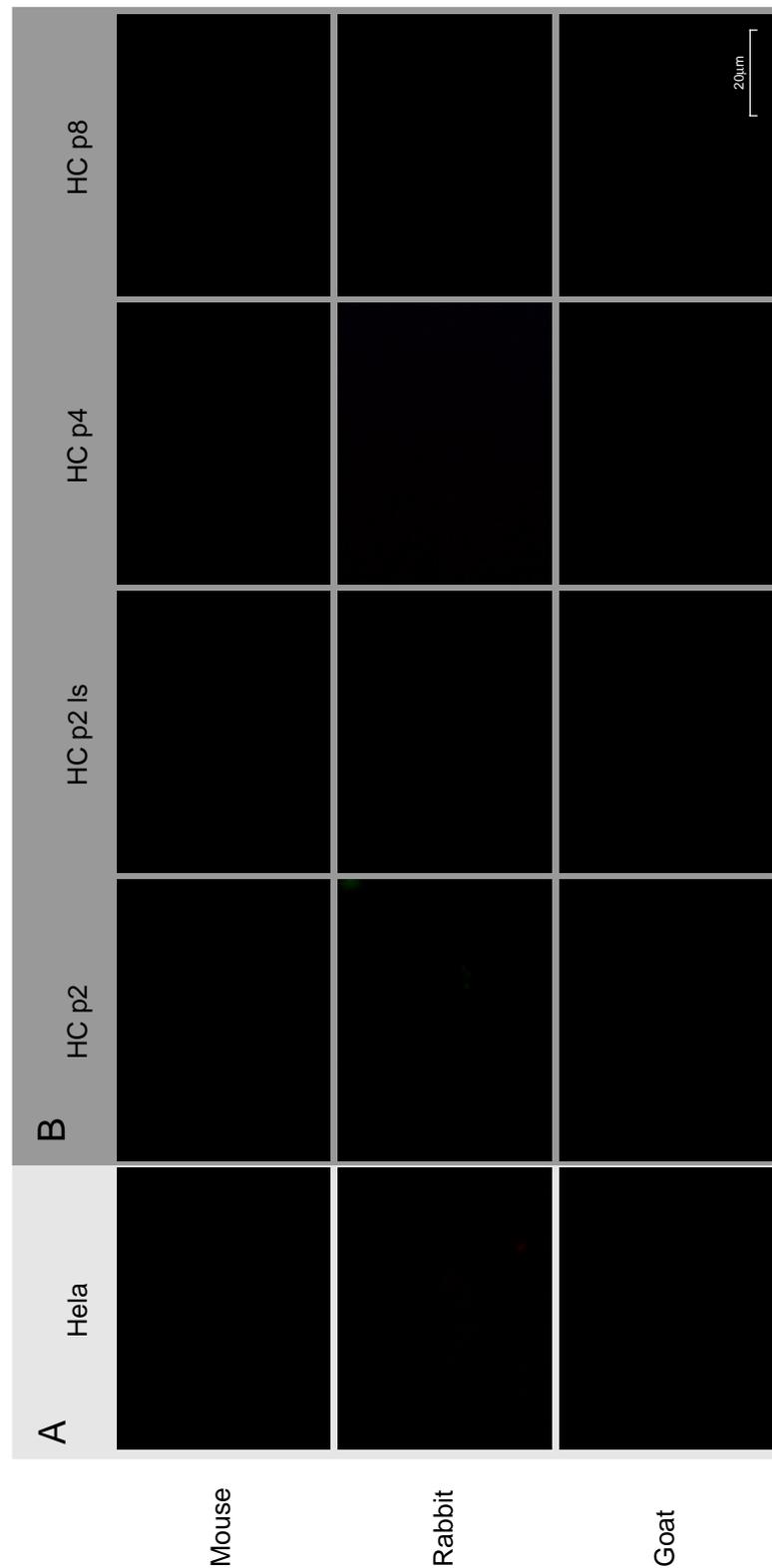


Abb. 20 Darstellung der Spezifität der Sekundärantikörper in HeLa-Zellen (A) und verschiedenen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten (B). *Hela* = HeLa-Zellen; *HC p2, p4, p8* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 1s* = humane Chondrocyten Kulturpassage 2 (0,1% FCS) *Mouse* = Anti-Maus-FITC, *Rabbit* = Anti-Kaninchen-FITC, *Goat* = Anti-Ziege-FITC. Maßstab = 20µm.

Tabelle 2 faßt die in Kapitel 3.3 und 3.4 geschilderten Ergebnisse noch einmal zusammen.

Antikörper	Immunantwort						
	<i>Hela</i>	<i>HT</i>	<i>HK</i>	<i>HC p2</i>	<i>HC p2 ls</i>	<i>HC p4</i>	<i>HC p8</i>
p15 ^{JNK4b}	+++	+++	++	-	+	+	++
p16 ^{JNK4a}	0	+	0	-	-	+	+
p18 ^{JNK4c}	0	++	+	-	0	0	+
p19 ^{JNK4d}	++	++	+	0	0	+	+
p21 ^{CIP1/WAF1}	+++	+++	++	++	++	++	+
p27 ^{KIP1}	++	+	0	0	+	+	+
p57 ^{KIP2}	0	+	+	-	+	++	++
pRb	+++	+++	+++	++	++	++	++
p107	+++	+	++	+++	++	++	++
p130	+++	+++	+++	++	++	++	+
CDK 2	++	+	0	++	++	++	++
CDK 4	++	++	++	++	++	++	+
CDK 6	+++	0	+	+++	+	++	++
Zyklin A	-	+	+	+	+	+	+
Zyklin D1	0	0	0	-	-	0	-
Zyklin E	0	0	0	0	-	-	0

Tab. 2 Zusammenfassung der Expressionmuster verschiedener G1/S-Regulatoren in unterschiedlichen Passagen kultivierter humaner Chondrocyten und nativem humanem Knorpelgewebe, sowie in Hela-Zellen und humanem Tonsillengewebe. Gelb unterlegt sind die Felder all der Passagen, bei denen sich die Expression gegenüber Kulturpassage 2 (grau) um mehr als nur eine Stufe unterschieden. *Hela* = Hela-Zellen; *HT* = humanes Tonsillengewebe; *HK* = humanes Knorpelgewebe; *HC p2*, *HC p4*, *HC p8* = Chondrocyten Kulturpassage 2, 4 und 8 (10% FCS); *HC p2 ls* = Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS); - = keine Immunantwort; 0 = sehr schwache Immunantwort; + schwach-positive Immunantwort; ++ = stark positive Immunantwort; +++ = sehr stark positive Immunantwort.

Zusammenfassend konnte für alle untersuchten Zellzyklusregulatoren in den Kernen kultivierter humaner Chondrocyten ein positiver Expressionsnachweis auf Proteinebene erbracht werden. Die Intensität der Färbungen zeigte dabei für distinkte Zellzyklusregulatoren über die verschiedenen Kulturpassagen hinweg, sowie unter unterschiedlichen Kulturbedingungen teilweise erhebliche Unterschiede.

Hierbei wiesen insbesondere die Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p18^{INK4c} eine zunehmende Expression von frühen zu späten Kulturpassagen hin auf. Von allen anderen untersuchten Zellzyklusregulatoren war eine vergleichbar auffällige Veränderung (Zunahme) der Expression mit zunehmender Passagenzahl nur für p57^{KIP2}, ein Mitglied der CIP/KIP-Familie, nachzuweisen.

Interessanterweise zeigten von allen untersuchten Zellzyklusregulatoren p15^{INK4b} und p57^{KIP2} auch eine signifikant veränderte Expressionsrate (Zunahme) bei Serumentzug.

Im Gegensatz dazu konnte für die Zyklinabhängige-Kinase CDK6 eine besonders starke Abnahme der Immunantwort nach Entzug der Serummitogene beschrieben werden.

3.4.2 Western-Blot

Die vorherigen Ergebnisse berücksichtigend haben wir uns in weiteren Untersuchungen auf die veränderte Expressionsrate der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p57^{KIP2}, sowie die Zyklinabhängige-Kinase CDK 6 konzentriert. Limitiertes humanes Zellkulturmaterial erlaubte in einem ersten detaillierten Versuchsansatz nur die semiquantitative Analyse eines Inhibitors. Da in unserem Labor detaillierte Kenntnisse der Untersuchung besonders der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren der CIP/KIP-Familie bestanden, und in der Literatur Zusammenhänge zwischen Knorpeldifferenzierung und p57^{KIP2}-Expression beschrieben sind, wurde hier zugunsten der Untersuchung dieses Inhibitorproteins auf die Untersuchung der anderen Regulatoren verzichtet.

In einem ersten Ansatz wurde zunächst wie unter Material und Methoden (Kap. 2) beschrieben der cytochemische Nachweis der Antigene anhand von Zellkulturüberständen von HeLa-Zellen etabliert und entwickelt. Dazu wurde das aus Zellkulturüberständen (n=10) erhaltene Total-Protein Zell-Lysat elektrophoretisch auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF Membranen geblottet und anschließend eine Immundetektion mit Antikörpern gegen p57^{KIP2} durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein rekombinantes p57^{KIP2}-Polypeptid ("human cells-17" Total-Protein Zell-Lysat) verwendet. Dieses Polypeptid zeigte überraschenderweise eine molekulare Größe von 38 kDa, nicht aber die erwartete Größe von 57 kDa, welche in dem Zell-Lysat der HeLa-Zellen jedoch vom Antikörper erkannt wurde. Entsprechend der in der Kontrolle erkannten 38 kDa Polypeptidbande konnte auch im HeLa-Zellkulturüberstand eine Polypeptidbande bei 38 kDa detektiert werden [Abb. 21].

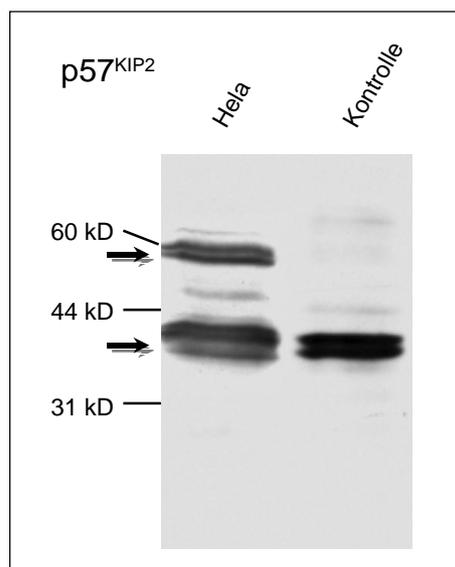


Abb. 21 Detektion von p57^{KIP2} in HeLa-Zellkulturüberständen mittels Western-Blot. *HeLa* = HeLa-Zellen, *Kontrolle* = "human cell-17" Total-Protein Zell-Lysat. Die Pfeile zeigen die detektierten Banden an.

In einem zweiten Ansatz wurde die Expression des Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteins p57^{KIP2} in Zellkulturüberständen unterschiedlicher Passagen kultivierter humaner Chondrocyten [Abb. 22A], sowie unter Serumentzug kultivierter humaner Chondrocyten [Abb. 22B] untersucht.

In Abbildung 22 ist ein Immunoblot mit anti-p57^{KIP2} Antikörpern zu sehen. Tatsächlich läßt sich für die 38 kDa-Polypeptidbande und schwächer auch für die 60 kDa-Polypeptidbande eine Zunahme des Signals von frühen zu späten Kulturpassagen hin beobachten [vergleiche Abb. 22A, HC p2 und HC p8].

Die vergleichende Untersuchung der Proteinexpression kultivierter humaner Chondrocyten in Kontrollbedingungen (10% Serum), bzw. unter reduzierten Serumbedingungen (0,1%), zeigt eine signifikante Verstärkung des Signals der 38 kDa und 60 kDa-Banden, insbesondere jedoch der 38 kDa-Bande gegenüber den unter Normalbedingungen kultivierten humanen Chondrocyten [vergleiche Abb. 22B, HC p2 und HC p2 ls].

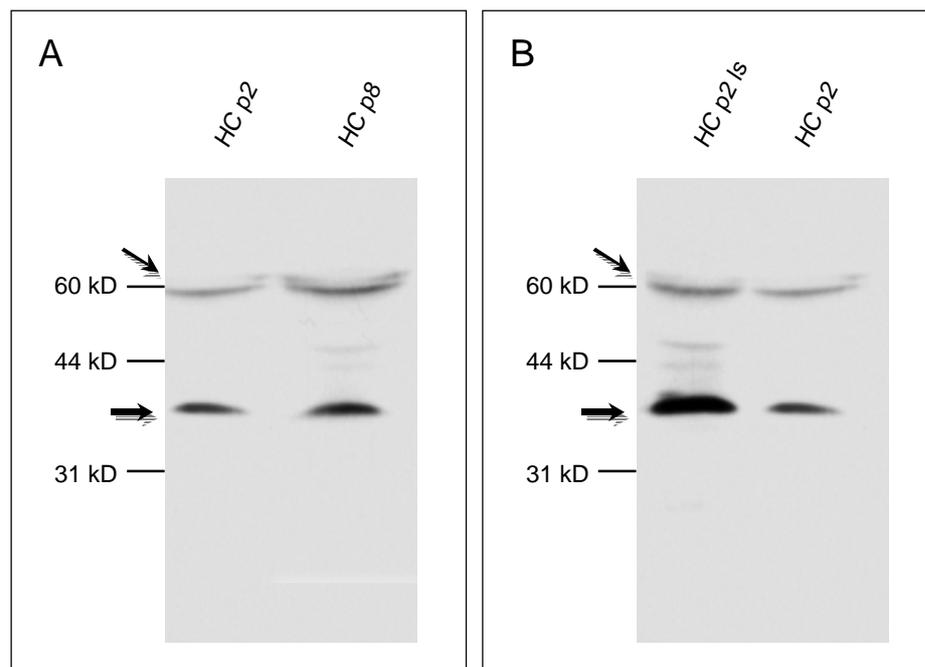


Abb. 22 Nachweis der differenzierungsgrad- und serummitogenabhängigen p57^{KIP2}-Expression in kultivierten humanen Chondrocyten mittels Western-Blot. *HC p2, und p8 = Total-Protein humaner Chondrocyten Passage 2 und 8 (10% FCS); HC p2, und p8 = Total-Protein humaner Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS). Die Pfeile zeigen die detektierten Banden an.*

Zusammenfassend zeigte die semiquantitative Untersuchung der Expression des p57^{KIP2} Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteins durch Western-Blots eine Verstärkung der Expression von frühen (Passage 2) zu späten (Passage 8) Kulturpassagen hin. Dieses Ergebnis unterstützt die bereits in den immunhistologischen Färbungen gewonnenen Ergebnisse und weist auf eine differenzierungsgradabhängige veränderte Expressionrate hin.

Darüber hinaus nimmt die Expression von p57^{KIP2} nach Reduktion der Serummitogene - also nach Hervorrufen eines künstlichen, reversiblen Proliferationsstops - sichtbar zu.

3.5 Vergleichende quantitative Untersuchung der Zellzyklusregulator-Expressionsprofile

Um auch für die Mitglieder der INK4-Familie die auf Proteinebene beobachtete veränderte Expressionsrate bei Veränderung der Passagenzahl oder Serumentzug quantifizieren zu können, wurde im folgenden ein Vergleich der Expression auf RNA-Ebene versucht. Die Mitglieder der Rb-Familie und CIP/KIP-Familie, zu denen p57^{KIP2} zählt, wurden zum direkten Vergleich in die Analyse eingeschlossen. Damit konzentrierten wir uns primär auf die Regulatoren, die bei Proliferationsstop hochreguliert wurden. Die Zyklinabhängige-Kinase CDK 6, die bei Serumentzug herunterreguliert wurde, wird von der Analyse ausgeschlossen.

3.5.1 Ribonuclease-Protection-Assay

Wie unter Material und Methoden (Kap. 2) beschrieben, wurde RNA aus humanen Chondrocyten, die unter unterschiedlichen Serumbedingungen kultiviert sowie verschieden häufig passagiert wurden, isoliert und mit Hilfe von einem speziell für die Untersuchung der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren der INK-4- und CIP/KIP-Familie geeigneten und zuvor radioaktiv markiertem, subtypspezifischen cDNA-Template (RiboQuantTM hCC-2; Becton Dickinson-Pharmingen, Heidelberg) hybridisiert. Nicht hybridisierte, einzelsträngige RNA-Reste wurden mit RNase verdaut. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch auf Röntgenfilm exponiert. Als Größenmarker wurden nicht verdaute, radioaktiv markierte RNA-Sonden definierter Größe, sowie zusätzlich Hela-Kontroll-RNA als Positiv- und Hefe-tRNA als Negativkontrolle aufs Gel gegeben. Die Analyse der Expression von p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p107, p130, und pRb ist beispielhaft an einer Autoradiographie in Abbildung 23 (S. 52) gezeigt.

Für die genauere Analyse der einzelnen belichteten Banden mußte auf das Programm "Image Master 1D" der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) zurückgegriffen werden, das die Stärke der Schwärzung des Röntgenfilms automatisch als objektiv vergleichbaren Zahlenwert errechnet. Für die weitere Untersuchung wurden die Banden herausgegriffen, die bereits rein optisch starke Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kulturpassagen oder -bedingungen aufwiesen. Die einzelnen Werte ergaben sich durch Errechnen der Mittelwerte aus zehn verschiedenen Ribonuclease-Protection-Assays, wobei für die unterschiedlichen Mitglieder der verschiedenen Proteinfamilien je nach Stärke der jeweiligen RNA-Expression auf unterschiedlich lang belichtete Röntgenfilme (1-8 Stunden) zurückgegriffen wurde, so daß das Signal erkennbar, jedoch nicht im Sättigungsbereich der Schwärzung des Röntgenfilmes war. Um Fehler durch unterschiedliche Mengen von eingesetzter RNA auszuschließen, wurden zusätzlich alle Lanes zuerst anhand der Standardmarker L32 und GAPDH ausnormalisiert.

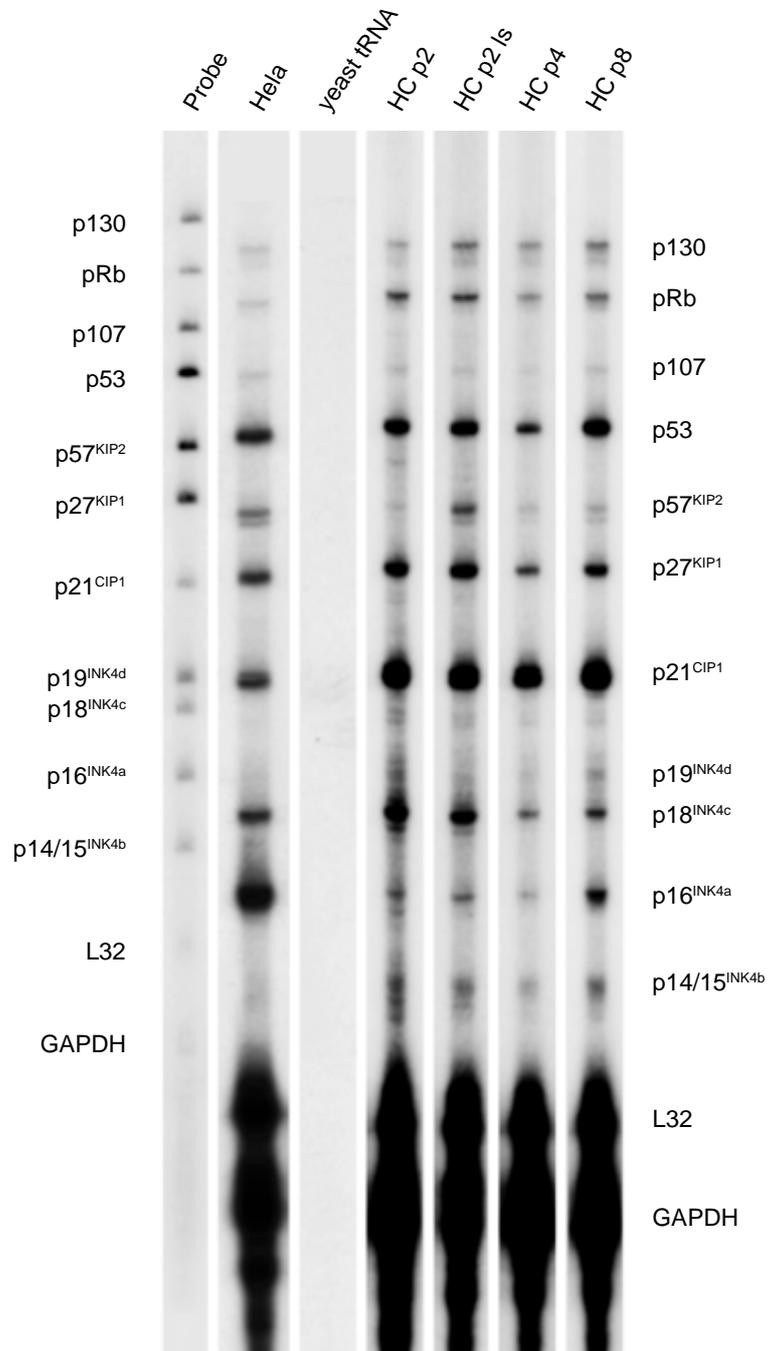


Abb. 23 Exemplarische Darstellung der Autoradiographie eines Ribonuclease-Protection-Assays. *Probe* = nicht geschützte Ribosonde (Marker), *Hela* = *Hela*-RNA (Positivkontrolle), *Yeast* = Hefe tRNA (Negativkontrolle), *HC p2, p4 und p8* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2, 4 und 8 (10% FCS), *HC p2 ls* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS).

Mit der Analyse der Expression der Zellzyklusregulatoren der INK4-Familie ($p15^{\text{INK4b}}$, $p16^{\text{INK4a}}$, $p18^{\text{INK4c}}$, $p19^{\text{INK4d}}$), der CIP/KIP-Familie ($p21^{\text{CIP1/WAF1}}$, $p27^{\text{KIP1}}$, $p57^{\text{KIP2}}$) und den Mitgliedern der Rb-Familie (pRb , $p107$, $p130$) mit Hilfe des Ribonuclease-Protection-Assays konnten tatsächlich im weitesten Sinne die Ergebnisse der Analyse auf Proteinebene bestätigt werden. Das Ergebnis einer Zunahme der Expression von $p18^{\text{INK4c}}$ bei zunehmender Passagenzahl konnte hingegen nicht bestätigt werden. Wie bereits in Kapitel 3.4 auf Proteinebene gezeigt, zeigt sich eine Zunahme der RNA für $p15^{\text{INK4b}}$ von Kulturpassage 2 nach Passage 8 [Abb. 24A; vergleiche HC p2, p4 und p8]. Nach Analyse der Daten durch das Programm "Image Master 1D" ergibt sich für die untersuchten Passagen eine Verstärkung des Signals um das 3-fache in Abhängigkeit von der Änderung des Differenzierungsgrades von frühen (Passage 2) zu späten (Passage 8) Kulturpassagen.

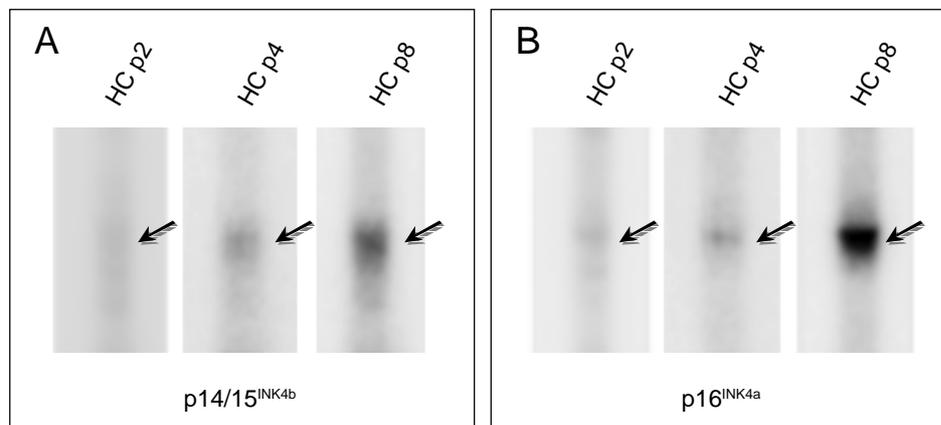


Abb. 24 Nachweis der differenzierungsgradabhängigen Expression von $p15^{\text{INK4b}}$ - (A) und $p16^{\text{INK4a}}$ -RNA (B) in kultivierten humanen Chondrocyten mittels Ribonuclease-Protection-Assay. HC p2, p4 und p8 = RNA humaner Chondrocyten Passage 2, 4 und 8 (10% FCS). Die Pfeile zeigen die detektierten Banden an.

Auch für die Expression der $p16^{\text{INK4a}}$ -RNA läßt sich eine signifikante Zunahme der RNA von frühen (Passage 2) zu späten Kulturpassagen (Passage 8) hin nachweisen [Abb. 24B; vergleiche HC p2, p4 und p8]. In der computergestützten Analyse des autoradiographischen Signals wird für $p16^{\text{INK4a}}$ -RNA eine Zunahme der Expression um den Faktor 2,6 von Passage 2 nach Passage 8 hin ermittelt.

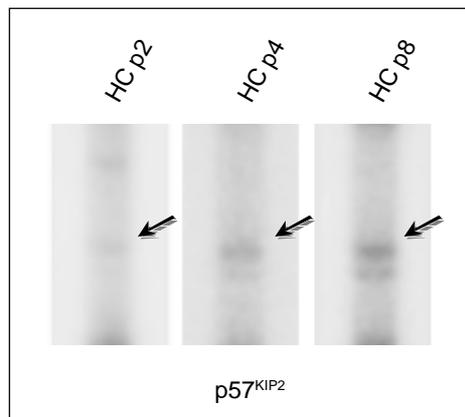


Abb. 25 Nachweis der differenzierungsgradabhängigen Expression von p57^{KIP2}-RNA in kultivierten humanen Chondrocyten mittels Ribonuclease-Protection-Assay. *HC p2, p4 und p8 = RNA humaner Chondrocyten Passage 2, 4 und 8 (10% FCS). Die Pfeile zeigen die detektierten Banden an.*

Eine Zunahme der Expression läßt sich auch für p57^{KIP2} auf RNA-Ebene nachweisen. Die optisch sichtbare Zunahme der p57^{KIP2}-RNA [Abb. 25; vergleiche HC p2, p4 und p8] erweist sich in der Computeranalyse als eine Verdoppelung der RNA-Expression.

Abbildung 25 faßt die Ergebnisse der Computeranalyse der differenzierungsgradabhängigen RNA-Expression in einem Balkendiagramm zusammen.

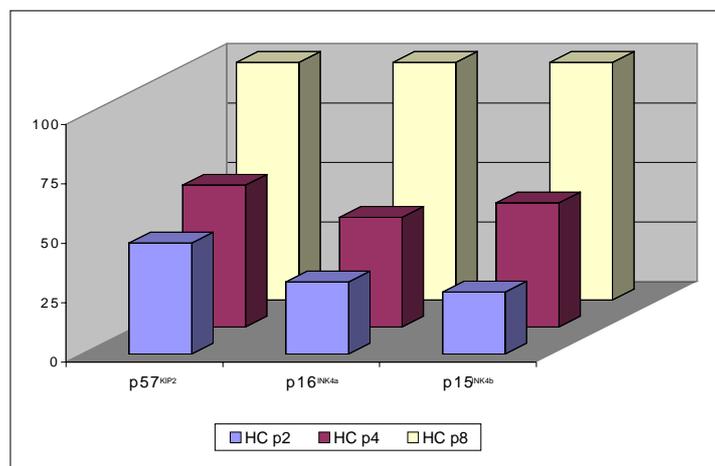


Abb. 26 Normalisiertes graphische Darstellung der RNA-Expressionsmuster der Cyclinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} in verschiedenen Passagen in humanen Chondrocyten. *HC p2, p4 und p8 = RNA humaner Chondrocyten Passage 2, 4 und 8 (10% FCS).*

Auf Proteinebene konnte durch Serumentzug eine signifikante Potenzierung der Expression insbesondere von p15^{INK4b} und p57^{KIP2} beobachtet werden.

Die mit einem Proliferationsstop einhergehende Veränderung der Expression durch Serumentzug konnte tatsächlich auch auf RNA-Ebene bestätigt werden. Nach Verringerung des Serumgehalts im Kulturmedium von 10% auf 0,1% zeigt sich eine Verstärkung des Signals für p15^{INK4b}-RNA [Abb. 27A; vergleiche HC p2 und p2 1s], die sich nach Softwareanalyse als Verdoppelung der Signalstärke beziffern lässt.

Bereits optisch erscheinen die Veränderungen der p57^{KIP2}-RNA-Expression im Vergleich von unter Normalbedingungen kultivierten humanen Chondrocyten zu humanen Chondrocyten, die unter reduzierten Serumbedingungen kultiviert wurden, deutlicher [Abb. 27B; vergleiche HC p2 und p2 1s]. Die Analyse der einzelnen Banden durch den Computer ermittelt hierfür eine mehr als vierfache Steigerung des autoradiographischen Signals.

Abbildung 28 (S. 56) zeigt dieses, durch Serumentzug induzierte, veränderte Expressionsmuster von p15^{INK4b} und p57^{KIP2} als Balkendiagramm.

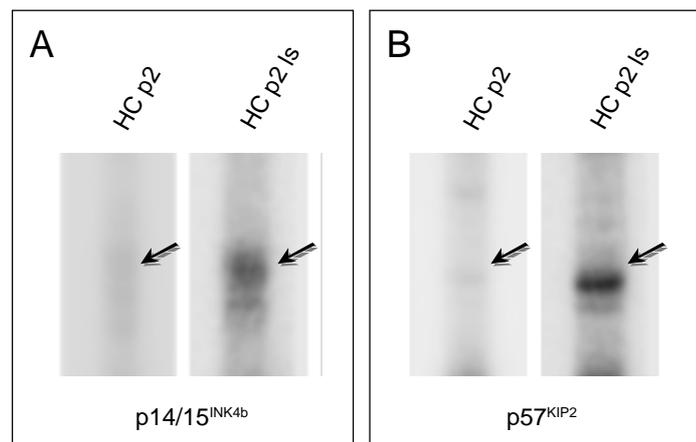


Abb. 27 Nachweis der serumabhängigen Expression von p15^{INK4b}- (A) und p57^{KIP2}-RNA (B) in kultivierten humanen Chondrocyten mittels Ribonuclease-Protection-Assay. *HC p2* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2 (10% FCS), *HC p2 1s* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS). Die Pfeile zeigen die detektierten Banden an.

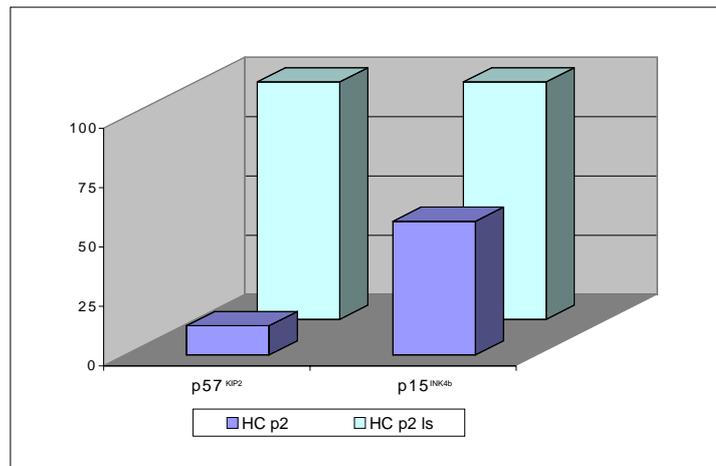


Abb. 28 Normalisierte graphische Darstellung der RNA-Expressionsmuster der Cyclinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine p15^{INK4b} und p57^{KIP2} unter unterschiedlichen Kulturbedingungen in humanen Chondrocyten. *HC p2* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2 (10% FCS), *HC p2 ls* = RNA humaner Chondrocyten Passage 2 (0,1% FCS).

Zusammenfassend konnte für alle untersuchten zyclinabhängigen-Kinaseinhibitoren ein positiver Nachweis auf RNA-Ebene erbracht werden.

Mit zunehmender Passagenzahl kommt es zu einer Zunahme der RNA von p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} um den Faktor 3 (p15^{INK4b}), 2,6 (p16^{INK4a}) bzw. 2 (p57^{KIP2}). Diese Ergebnisse korrelieren mit den bereits in Kapitel 3.4 auf Proteinebene beschriebenen Ergebnissen.

Mit Entzug von Serummitogenen kommt es zu einem zweifachen (p15^{INK4b}), bzw. mehr als vierfachen (p57^{KIP2}) Anstieg der entsprechenden RNA. Auch diese Ergebnisse korrelieren mit den auf Proteinebene beschriebenen Ergebnissen (Kap. 3.4).

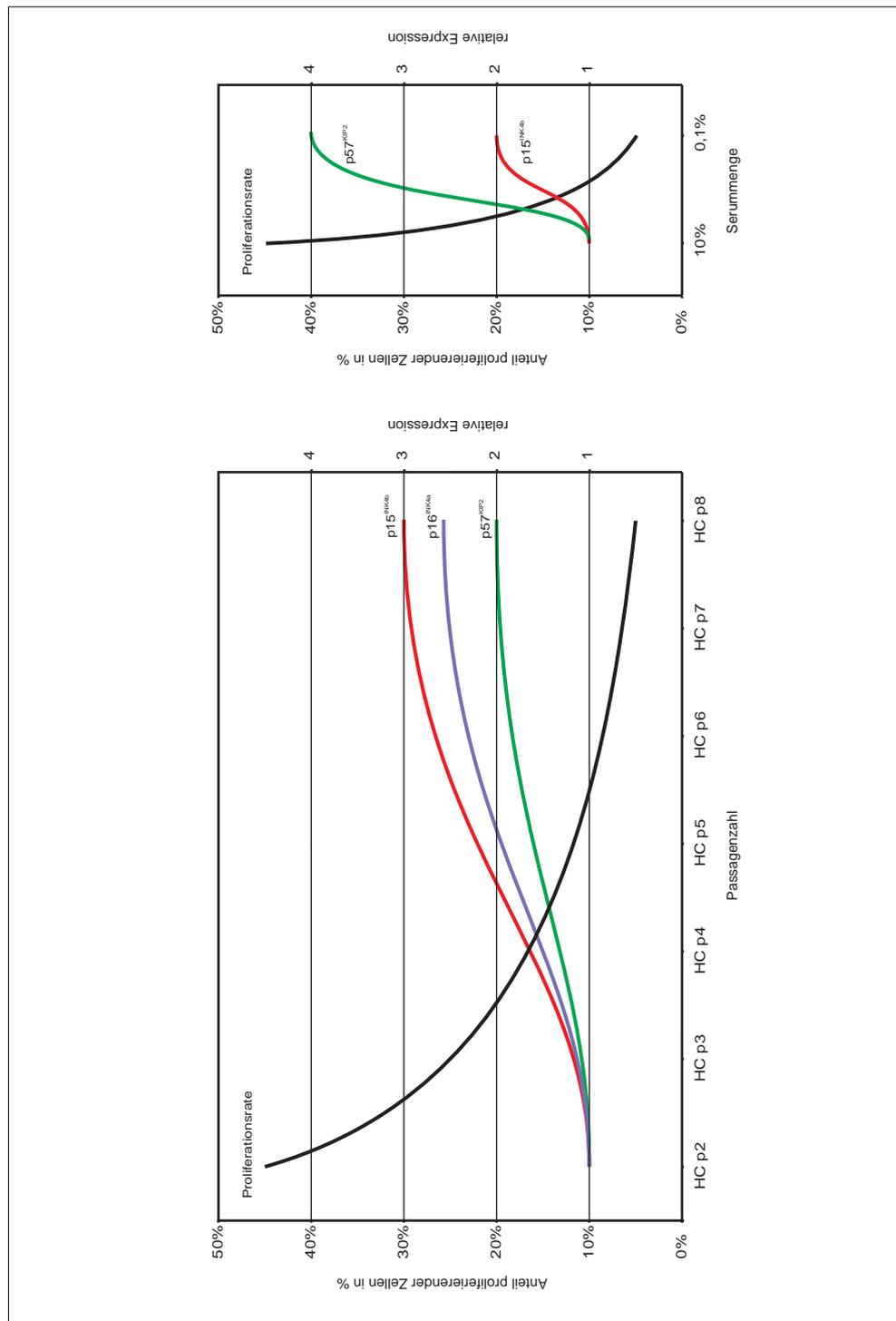


Abb. 29 Zusammenfassende graphische Darstellung der serumabhängigen und differenzierungsabhängigen Veränderungen der Expression der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} kultivierter humaner Chondrocyten (rechte Skala). Im Vergleich dazu ist die Anzahl proliferierender Zellen aufgetragen (linke Skala). Beachte die Korrelation von Proliferationsrate und Expressionsrate von p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} bei Serumentzug und zunehmender Passagenzahl. HCp2 bis p8 = humane Chondrocyten Passagen 2 bis 8; ■ = Proliferationsrate, ■ = p15^{INK4b}-Expression, ■ = p16^{INK4a}-Expression, ■ = p57^{KIP2}-Expression; 1 - 4 = relative Expressionsrate.

Kapitel 4:

DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte als Ziel einen Ansatz zu finden, über die Manipulation von Zellzyklusregulatoren das Proliferationsverhalten von Knorpel zu beeinflussen. Dazu wurde die Expression der Cykline A, D1 und E, der Zyklinabhängige-Kinasen 2, 4 und 6, der Proteine der Rb-Familie (pRb, p107, p130), sowie der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine der INK4-Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) und der CIP/KIP-Familie (p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}) in nativem humanem Knorpelgewebe und daraus gewonnenen kultivierten humanen Chondrocyten untersucht. Das Expressionsmuster einzelner Zellzyklusregulatoren kultivierter humaner Chondrocyten wurde verglichen mit dem Proliferationsverhalten der kultivierten humanen Chondrocyten, das sich in Abhängigkeit von der Anzahl der Aufteilungen der kultivierten Zellen (Passagenzahl) und der Anwesenheit von Serummitogenen verändert.

Die Expressionsanalyse der einzelnen Regulatoren zeigte besonders für die Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} ein sich mit der Dauer der Subkultivierung und den Kulturbedingungen verändertes Expressionsmuster, was erstmals auf eine funktionelle Beteiligung dieser Regulatoren an unterschiedlichen Differenzierungsprozessen hinweist. Die darüber hinaus gemachte Beobachtung, daß humanes Knorpelgewebe und kultivierte Chondrocyten ein vergleichbar verändertes Expressionsmuster dieser Regulatoren aufweisen deutet an, daß sich Knorpelgewebe und kultivierte Chondrocyten gleichermaßen als Modellsystem zur Überprüfung der Folgen einer künstlichen Manipulation der Expression verschiedener Zyklinabhängiger-Kinaseinhibitorproteine auf die Proliferationsrate und damit möglicherweise induzierbare Regeneration von Knorpelgewebe eignen würden. Diese Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine könnten somit zukünftige Ziele eines Therapieansatzes zur Neuschaffung von Knorpel nach vorausgegangener *ex-vivo* Zellexpansion oder aber auch der *in-vivo* Regeneration von Knorpelgewebe sein. Die Ergebnisse werden im folgenden einzeln diskutiert.

4.1 Änderung des Zellhabitus und des Differenzierungsgrades von humanen Chondrocyten *in-vitro* in Abhängigkeit von der Zahl durchlaufener Zellteilungen

In einem ersten Ansatz erfolgte die Beschreibung des Habitus von frischem humanem Knorpel und die Untersuchung der Zusammensetzung der die Chondrocyten umgebenden Matrix durch histologische und immunhistologische Färbungen. Außerdem erfolgte die Beschreibung des sich mit der zunehmender Subkultivierung sukzessiv verändernden Habitus kultivierter Chondrocyten und der damit einhergehenden Änderung der Expression unterschiedlicher Matrixproteine (Kap. 3.1).

Die Zusammensetzung der Grundsubstanz hängt vom jeweiligen Knorpeltyp ab, von denen es elastischen (z.B. Ohrmuschel), fasrigen (z.B. Zwischenwirbelscheiben) und hyalinen Knorpel (z.B. Gelenke oder Nasenscheidewand) gibt. Besprochen werden soll in dieser Arbeit nur die Funktion und der Aufbau hyalinen Knorpels. Die Grundsubstanz oder Matrix besteht im Allgemeinen zu 60-70% aus Wasser. Die Trockensubstanz der Matrix setzt sich zu je ~40-50% aus Kollagenen und Glykanen (Hyaluronsäure und Proteoglykosaminoglykane) und zu ~10% aus Mineralien zusammen. Die Knorpelhöfe sind dabei Bereiche, die von der Durchsetzung der Grundsubstanz durch Kollagenfibrillen ausgenommen sind, wodurch sie sich im histologischen Bild deutlich von den Interterritorien unterscheiden. In die amorphe Grundsubstanz sind bei hyalinem Knorpel meist große Mengen Fibrillen aus überwiegend Kollagen II eingebettet, das aufgrund seiner großen Verbreitung in Knorpel und seinem Fehlen in anderen Geweben als wichtiger, wenn nicht sogar als DER Knorpelmarker betrachtet wird. Die Chondrone oder Territorien enthalten in hyalinem Knorpel ungefähr fünf bis zehn Knorpelzellen (Chondrocyten) [Junqueira & Carneiro, 1996; van der Rest & Garrone, 1991].

Die Bestandteile der unstrukturierten Matrix des humanem Knorpelgewebes konnten durch histologische Färbemethoden bestimmt (Kap. 3.1.1) und mittels Antikörpern näher charakterisiert werden (Kap. 3.1.2). Histologisch dargestellte Mucopolysaccharide konnten als Knorpelproteoglykane, Kollagene als knorpelspezifisches Kollagen II identifiziert werden, während Färbungen gegen eher bindegewebspezifisches Kollagen I negativ blieben (Kap. 3.1.2). Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, einer ausschließlich in Knorpel vorkommenden Expression von Kollagen II, sowie dem Fehlen einer bindegewebspezifischen Expression von Kollagen I, überein [ibid.].

Eine spezielle Eigenschaft der Chondrocyten zeigte sich nach Isolation der Zellen aus ihrem Gewebeverband. Im Gegensatz zu vielen anderen menschlichen Zellen ist es Chondrocyten möglich - nachdem sie in Kultur genommen wurden - wieder zu dedifferenzieren, um nach kurzer Ruhezeit mit der Proliferation zu beginnen [Holtzer et al., 1960]. Dabei zeigte sich bei fortlaufender Subkultivierung der humanen Chondrocyten eine sukzessive Veränderung des morphologischen Habitus (Kap. 3.1.3). Die anfangs eher polygonal geformten Zellen nahmen mit zunehmender Passagenzahl ein immer mehr fibroblastenartiges Aussehen an. Auch die in diesem Zusammenhang in der Literatur beschriebene Veränderung der Expression knorpelspezifischer Matrixproteine, wie z.B. Kollagen II und Knorpelproteoglykane, zugunsten des eher fibroblastenspezifischen Kollagen I [Benya et al., 1978; Mayne et al., 1976; von der Mark et al., 1977] konnte im Verlauf dieser morphologischen Veränderung beobachtet werden und kann als Hinweis auf eine Dedifferenzierung gelten (Kap. 3.1.4).

Es zeigt sich also, daß mit zunehmender Subkultivierung der Knorpelzellen ein Dedifferenzierungsprozeß voranschreitet, in dessen Verlauf nicht nur der Habitus der kultivierten humanen Chondrocyten zunehmend dem Habitus von Fibroblasten ähnelt, sondern sich auch die Expression der knorpelspezifischen Matrixproteine zugunsten einer fibroblastentypischen Matrixproteinexpression umstellt.

4.2 Änderung des Proliferationsverhaltens humaner Chondrocyten *in-vitro* in Abhängigkeit von der Anzahl durchlaufener Zellteilungen und Anwesenheit von Serummitogenen

In einem zweiten Ansatz wurde das Proliferationsverhalten humaner Chondrocyten in der Kultur eingehender untersucht (Kap. 3.2).

Formal läßt sich der Zellzyklus in vier Phasen unterteilen: G1-, S-, G2- und M-Phase. Im Laufe der G1-Phase (vom Englischen gap = Lücke) überprüft die Zelle ihre Umweltbedingungen und Größe, bevor sie sich in der S-Phase (für Synthese) der DNA Replikation widmet. Erst nach Überprüfung der korrekt abgeschlossenen DNA Replikation während der G2-Phase beginnt die Zelle in der M-Phase (für Mitose) mit ihrer eigentlichen Teilung - erst des Kernes und dann schließlich der ganzen Zelle [Pagano, 1998] [Abb. 30; S. 63].

Eine entscheidende Rolle in der Proliferationskontrolle - also der Größenzunahme mit anschließender Teilung der Zelle - kommt dabei der G1-Phase zu. Die Entscheidung zur Zellteilung oder Zelldifferenzierung wird am sogenannten Restriktionspunkt der G1-Phase getroffen. Sind an diesem Punkt alle für eine Teilung erforderlichen Gegebenheiten vorhanden, so überschreitet die Zelle den

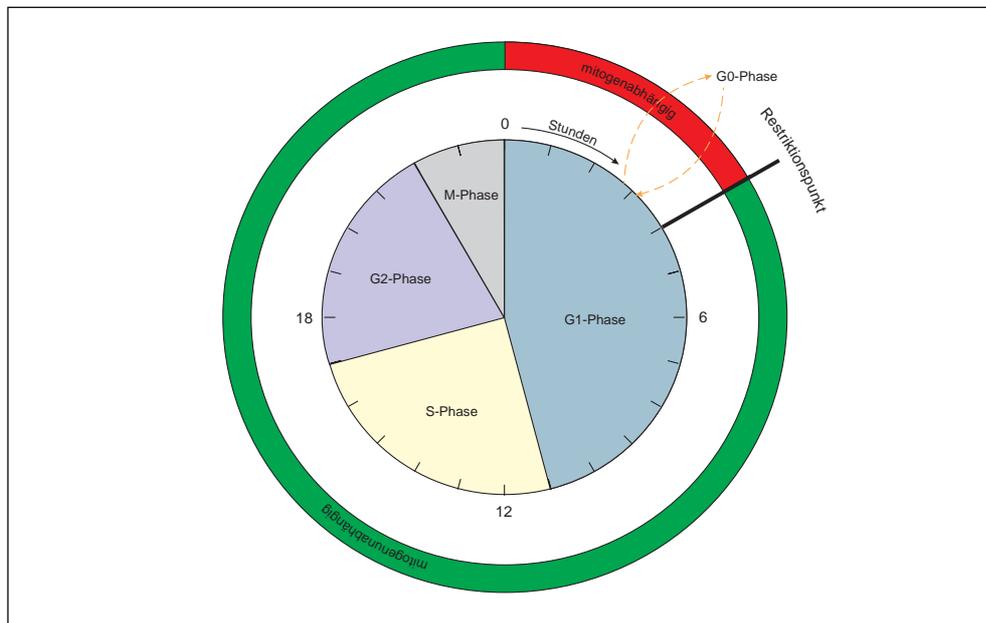


Abb. 30 Der Zellzyklus der Mammalier mit einer Generationsdauer von 24 Stunden. Die ersten drei rund 22 Stunden dauernden Phasen (G1, S, G2) bilden die Interphase. In ihnen findet die Kontrolle der Zell- und Umweltbedingungen, die Synthese zellulärer Makromoleküle, sowie die Replikation der DNA statt. In den verbleibenden letzten zwei Stunden erfolgt die eigentliche Zellteilung. Während der ersten vier Stunden nach erfolgter Zellteilung kann die Zelle empfindlich auf Veränderungen in ihren Umweltbedingungen reagieren. Sie kann z.B. bei mangelnder Versorgung den Zyklus verlassen und in den ruhenden Zustand der G0-Phase übertreten. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes läuft das übrige Schema des Zellzyklus bis zum Restriktionspunkt des folgenden Zyklus immer konstant ab [nach Alberts et al., 1995].

Restriktionspunkt und führt anschließend einen kompletten Zellzyklus bis zum Restriktionspunkt der darauffolgenden G1-Phase aus. Die Abfolge der Phasen ist dabei sehr starr und ihre Dauer variiert normalerweise nur zwischen unterschiedlichen Zelltypen [Mitchinson, 1971; Nurse, 1975; Murray & Hunt, 1993].

Im Gegensatz zum immer gleich verlaufenden übrigen Teil des Zellzyklus ist die Dauer der G1-Phase sehr variabel. Sie kann je nach physiologischen Gegebenheiten mitunter sogar bis zu Jahre dauern (z.B. bei Sporen der Hefen). Die Zelle befindet sich dann in einer Art Ruhezustand, der G0-Phase, welche auch als Quieszenz bezeichnet wird. Diese Quieszenz ist jedoch ein reversibler Prozeß, den man bei Zellkulturen auch künstlich - durch den Entzug von Serum, oder den darin enthaltenen Mitogenen - hervorrufen kann, so daß es den Zellen nicht möglich ist, über den Restriktionspunkt in der Mitte der G1-Phase hinweg fortzuschreiten [Pardee, 1989]. Der Zeitpunkt des Restriktionspunktes kann sehr genau definiert werden, als der Punkt nach Beginn der G1-Phase, ab dem ein Entzug von Mitogenen keinen Einfluß mehr auf das Beenden eines begonnenen Zellzyklus hat. Dieser Punkt findet

sich bei typischen Mammalier-Zellen rund 4h nach Beendigung einer Mitose [Zetterberg & Larsson, 1985]. Eine ruhende Zelle kann jedoch jederzeit bei Änderung der Bedingungen wieder aus ihrem Ruhezustand "erwachen" und erneut proliferieren [Stein et al., 1985]. Ganz entsprechend solcher Beobachtungen zeigten auch die kultivierten humanen Chondrocyten nach Reduktion der Serummitogene von 10% FCS auf 0,1% FCS eine Veränderung des Proliferationsverhaltens. Die Proliferationsraten sanken von ursprünglich über 40% auf unter 5% ab (Kap. 3.2.2). Dieses Verhalten ähnelt stark dem Verhalten kultivierter Fibroblasten unter ähnlichen Bedingungen [Larsson et al., 1989; Stein & Dulic, 1995; Zetterberg & Larsson, 1985] und konnte für Chondrocyten hier zum ersten mal gezeigt werden.

Durch die erneute Zuführung von Serummitogenen konnte eine erneute Zunahme der Proliferationsraten auf rund 95% des Wertes vor der Serumreduktion eingeleitet werden. Damit konnte gezeigt werden, daß auch bei kultivierten humanen Chondrocyten die durch Serumreduktion künstlich hervorgerufenen Quieszenz ein nur reversibles Verlassen des Zellzyklus bedeutet, das eine jederzeitige Wiederaufnahme der Proliferation ermöglicht.

Ganz anders verhält es sich bei dem veränderten Proliferationsverhalten, das über die Veränderung der Anzahl der Zellteilungen erreicht wird.

So konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden, daß mit zunehmender Passagenzahl der kultivierten humanen Chondrocyten die anfänglichen Proliferationsraten von über 40% in Passage 2 ab Passage 8 zunehmend auf einen Wert unter 5% abfielen (Kap. 3.2.1). Dieses Verhalten wurde bereits 1961 von Hayflick und Moorhead an normalen diploiden Fibroblasten geschildert und ist seitdem als das Hayflick-Limit bekannt [Van Zant & de Haan, 1999]. Es handelt sich dabei um einen, in vielen humanen Zelltypen oder Zellen anderer vertebrater Spezies im Zusammenhang mit der Alterung von Zellen beschriebenen Prozeß, dessen Ursachen bis heute nicht genau geklärt sind [Cristofalo & Pignolo, 1993]. Die Meinungen über die Gründe für die Einstellung der Proliferation nach gewisser Subkultivierung gehen von einem p53 mediierten Prozeß [Afshari et al., 1993; Atadja et al., 1995; Kulju & Lehman, 1995; Vaziri & Benchimol, 1996; Wynford Thomas, 1996] oder einem davon abhängigem durch die Expression von p21^{CIP1/WAF1} ausgelöstem Proliferationsstop [Afshari et al., 1996; Alcorta et al., 1996; el Deiry et al., 1993; Noda et al., 1994], aber auch von einer Rolle von p16^{INK4a} [Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Palmero et al., 1997; Serrano et al., 1997a; Stein et al., 1999; Stein & Dulic, 1998; Zindy et al., 1997], bis hin zur Theorie des Abbaus von Telomeren [Bodnar et al., 1998; Campisi, 1997; Chiu & Harley, 1997; Greider & Blackburn, 1985] aus.

Der Grund dieser Einstellung der Proliferation mit zunehmender Subkultivierung kann, wie bereits angeführt, auch in der Steuerung unterschiedlicher zellbiologischer Zustände durch verschiedene Zellzyklusregulator-Proteine gefunden werden, die Wachstum und Teilung der Zelle koordinieren. Dies ist der primäre Grund, warum in der vorliegenden Studie die Analyse von Zellzyklusregulatoren zur putativ zukünftigen Manipulation des Proliferationsverhaltens von humanen Chondrocyten in Erwägung gezogen wurde. In wie weit dieses System es erlaubt hier einzugreifen, wird sich erst noch erweisen müssen.

4.3 Änderung der Proteinexpression von Zellzyklusregulatoren in humanen Chondrocyten *in-vitro* in Abhängigkeit von der Anzahl durchlaufener Zellteilungen und Anwesenheit von Serummitogenen

In einem weiteren Ansatz wurde die Expression von Zellzyklusregulatorproteinen *in-vitro* an humanem Kontrollgewebe, humanen Zellkultursystemen, humanem Nasenseptengewebe, sowie in kultivierten humanen Chondrocyten untersucht und eine quantitative Analyse der RNA-Expression unternommen.

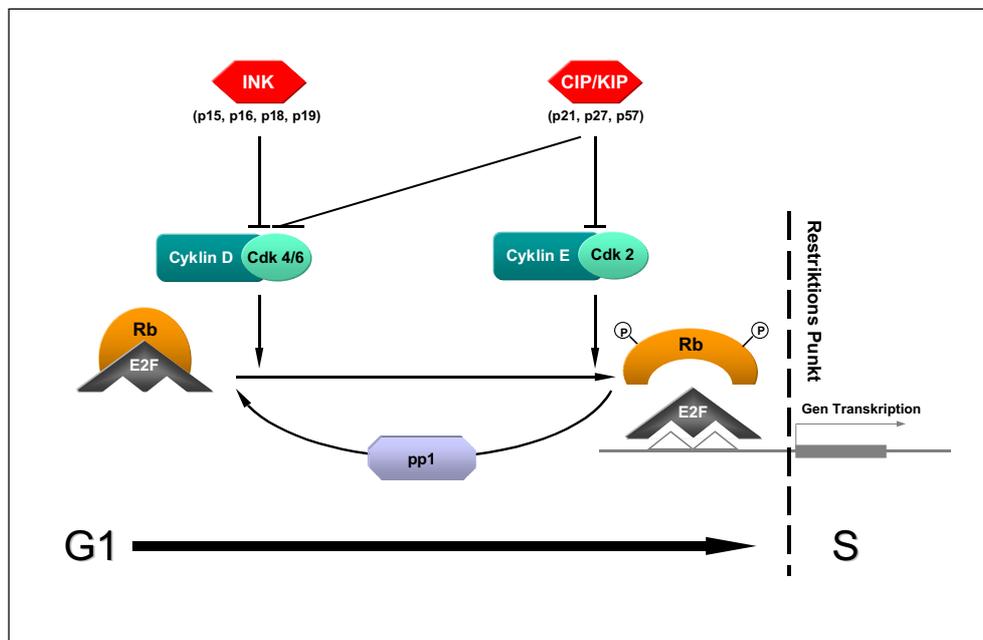


Abb. 31 Kontrolle der Gentranskription über Veränderung des Phosphorylierungszustands des Rb-Proteins. Die durch das aktivierte, hypophosphorylierte Rb-Protein gebundenen Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie können erst nach einer durch die Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins bedingten Konformationsänderung dieses Proteins am Gen die Transkription initiieren. Die Phosphorylierung des Rb-Proteins wird von den durch die Zykline aktivierten Zyklinabhängigen-

Kinasen (CDK) vollzogen. Zyklinabhängige-Kinaseinhibitorproteine (CKI) der CIP/KIP- und INK-Familien können die Aktivität der Zyklin-CDK-Komplexe blockieren und damit die Rb-Phosphorylierung verhindern. Mitglieder der Familie der Typ-1-Protein-Phosphatasen (PP1) bewirken durch Dephosphorylierung des Rb-Proteins eine Rückführung des Rb-Proteins in den aktivierten Zustand (nach Raff, 1996 und Mittnacht, 1998).

Zellzyklusregulatoren determinieren die unterschiedlichen zellbiologischen Zustände des Zellzyklus und beeinflussen damit eventuell direkt das Proliferationsverhalten von Zellen. So wird das Fortschreiten des Zellzyklus aus der Ruhephase (G1) über den G1-Restriktionspunkt hinweg zur Initiation der DNA-Synthese (S-Phase) bei Mammaliern positiv durch die Zyklinabhängigen-Kinasen (CDK) [Morgan, 1997] und deren aktivierende Untereinheiten, die Zykline und negativ durch Zyklinabhängige-Kinaseinhibitoren (CDKI) der CIP/KIP- und der INK4-Familie reguliert [Sherr & Roberts, 1999] [Abb. 31; S. 66].

Bisher ist in der Literatur nur von positiver Expression der Zellzyklusregulatoren der Rb-Familie p107 und p130 [Cobrinik et al., 1996] und einem Mitglied der CIP/KIP-Familie, nämlich p57^{KIP2} [Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997] in Knorpelgewebe berichtet worden, die in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

In jedem Zelltyp besteht eine für diesen Zelltyp spezifische Verteilung der unterschiedlichen Zellzyklusregulatoren, wobei sich dabei aktivierende und inhibierende Regulatoren im allgemeinen die Waage halten [Soos et al., 1998]. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zu Gunsten der einen oder der anderen Seite - durch Mitogene, oder andere Faktoren - kann dabei eine Veränderung des Verhaltens der Zelle bezüglich ihrer Entscheidung die DNA-Synthese zu initiieren, oder in dem ruhenden Zustand der G0-Phase zu verbleiben, bewirken [Abb. 32].

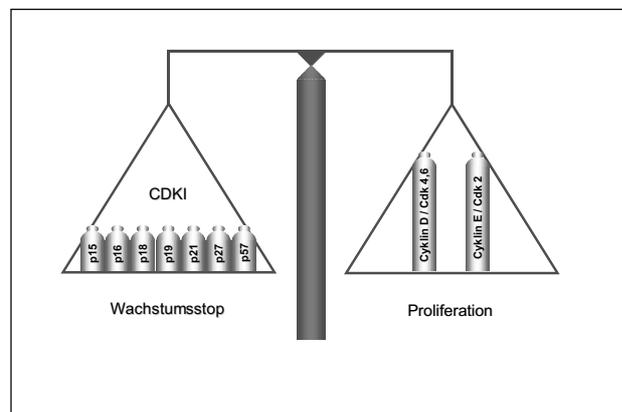


Abb. 32 Prinzipielle Darstellung der gegenseitigen Beeinflussung von exzitatorischen und inhibitorischen Zellzyklusregulatoren; das Verhältnis von Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren (CDKI) zu Zyklin/Zyklinabhängigen-Kinase (CDK)-Komplexen bestimmt den Proliferationszustand der Zelle. Links sind die einzelnen CDKIs zu se-

hen, rechts die Zyklin/CDK-Komplexe. Abhängig vom Zelltyp variieren die Mengen der verschiedenen Proteine. Das stöchiometrische Gleichgewicht der Proteine deutet an, daß, sobald die Menge der Zyklin/CDK-Komplexe die Menge der CDKIs übersteigt, es zu Proliferation kommt (nach Soos et al., 1998).

In diesem Zusammenhang ist die in der vorliegenden Studie gemachte Beobachtung einer signifikant veränderten Expression von ganz distinkten Zellzyklusregulatoren der Mitglieder der INK4-Proteinfamilie (p15^{INK4b} und p16^{INK4a}) und der CIP/KIP-Familie (p57^{KIP2}) ausgesprochen interessant.

Tatsächlich traten Expressionsunterschiede für die Mitgliedern der INK4-Proteinfamilie, sowie für p57^{KIP2} besonders deutlich zu Tage. So konnte für die Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p57^{KIP2} eine Verstärkung der Protein-Expression von frühen (Passage 2) zu späten (Passage 8) Kulturpassagen beobachtet werden. Besonders deutlich war eine solche Verstärkung für p57^{KIP2} nachzuweisen und konnte auf Proteinebene in der Immunhistologie und im Western-Blot, sowie auf RNA-Ebene im Ribonuclease-Protection-Assay bestätigt werden.

In der Literatur wird das p57^{KIP2} Genprodukt als Protein beschrieben, dessen errechnete Größe 37,3 kDa beträgt, das jedoch auf SDS-Polyacrylamid-Gelen mit einer Größe von 57 kDa wandert [Lee et al., 1995]. Wir konnten zwei unterschiedlich starke Banden bei 38 kDa und 60 kDa nachweisen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen der errechneten und der tatsächlichen Migrationsgröße in der SDS-Page wird in der Literatur nicht gegeben. Bei der von uns detektierten 38 kDa-Polypeptidbande handelt es sich vermutlich um ein durch sterische Bindungen in der Migrationsgröße verändertes Produkt des eigentlichen 57 kDa Proteins.

Auch für p15^{INK4b} und p16^{INK4a} konnte eine veränderte Expression auf Protein- und auf RNA-Ebene gezeigt werden. Nach computergestützter Analyse der autoradiographisch belichteten Röntgenfilme konnte für p15^{INK4b} eine dreifache und für p16^{INK4a} eine 2,6-fache Steigerung der entsprechenden RNA-Expression beobachtet werden. Einzig für p18^{INK4c} konnte eine putative Potenzierung der beobachteten Erhöhung der Proteinexpression in Kultur nicht bestätigt werden. Wir gehen vorerst davon aus, daß nur p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} mit zunehmender Subkultivierung - und damit mit abnehmender Proliferationsrate potenziert werden.

Expressionsunterschiede in der Protein-Expression fielen aber auch nach Reduktion der Serummitogene für p15^{INK4b}, p57^{KIP2} und die Zyklinabhängige-Kinase CDK 6 auf. Erneut traten sie im Falle von p57^{KIP2} besonders deutlich zu Tage und konnten in der Immunhistologie, im Western-Blot und auf RNA-Ebene im Ribonuclease-Protection-Assay bestätigt werden.

Damit kommt diesen Regulatoren eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Differenzierungs- und Zellalterungsprozessen in humanen Chondrocyten zu.

Wie kann man sich eine solche mögliche Kontrolle der Proliferation und Differenzierung vorstellen?

Tatsächlich werden beiden Gruppen der Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitoren - der INK4- und der CIP/KIP-Familie eine bedeutende Rolle bei der Proliferations- und Differenzierungskontrolle zugeschrieben. Die INK4-Familie besteht aus vier zu ~40% homologen Proteinen, p15^{INK4b} [Hannon & Beach, 1994], p16^{INK4a} [Serrano et al., 1993] p18^{INK4c} [Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995] und p19^{INK4d} [Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995], die alle im Zusammenhang mit der Tumorgenese eine Rolle spielen. P16^{INK4a} wird außerdem im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Alterung von Zellen

zugeschrieben [Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Palmero et al., 1997; Ruas & Peters, 1998; Serrano, 1997b; Serrano et al., 1997a; Stein et al., 1999; Stein & Dulic, 1998; Zindy et al., 1997]. Auch für kultivierte humane Chondrocyten scheint die Akkumulation von p16^{INK4a} für die Einleitung des postmitotischen Ruhezustands der Seneszenz mitverantwortlich zu sein, wie die Ergebnisse dieser Studie vermuten lassen. Während p18^{INK4c} eine Rolle bei der Steuerung eines G1-Proliferationsstops und der terminalen Differenzierung in hämatopoetischen Zellen zugeschrieben wird [Morse et al., 1997], wurden für p15^{INK4b} in der Literatur bisher keinerlei ähnliche Funktionen bei der Regulation des postmitotischen Ruhezustands genannt. Vielmehr wird für p15^{INK4b} noch eine weitere Funktion als Verstärker des p27^{KIP1} mediierten Proliferationsstops beschrieben. Hierbei kommt es durch p15^{INK4b} zu einer Verdrängung des Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteins p27^{KIP1} von den CDK 4- und CDK 6-Komplexen und dadurch zu einer Akkumulation dieses jetzt freien CDKIs an CDK 2-Cyclin E Komplexen [Reynisdottir & Massague, 1997]. Des Weiteren wird in der Literatur von einer Hochregulation von p15^{INK4b} immer im Zusammenhang mit der Gabe des Proliferationshemmers TGF- β berichtet [Hannon & Beach, 1994; Reynisdottir & Massague, 1997; Reynisdottir et al., 1995], so daß für die in der vorliegenden Studie beobachteten Verstärkung der p15^{INK4b}-Expression mit zunehmender Subkultivierung der Zellen hypothetisch von einem der p16^{INK4a}-Regulation ähnlichem Prozeß ausgegangen wird.

Die Familie der *CIP/KIP*-Proteine wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen beschrieben. Ihre drei Mitglieder p21^{CIP1/WAF1} [Dulic et al., 1994; el Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994; Xiong et al., 1993], p27^{KIP1} [Polyak et al., 1994; Polyak et al., 1994; Toyoshima & Hunter, 1994] und p57^{KIP2} [Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995] enthalten alle in ihren aminoterminalen Enden charakteristische Motive, die es ihnen erlauben, an unterschiedlichste Zykline und CDKs zu binden. Eingehende Analysen zur Proliferationskontrolle in Fibroblasten wurden speziell für p21^{CIP1/WAF1} und p27^{KIP1} unternommen, wobei sowohl p21^{CIP1/WAF1} [Noda et al., 1994] als auch p27^{KIP1} [Coats et al., 1996] bei Serummitogenmangel-bedingter Quieszenz auf RNA- und Protein-Ebene hochreguliert wurde.

Die Untersuchung von p21^{CIP1/WAF1}-gendetierten Mäusen zeigte keine Entwicklungsabnormalitäten, jedoch Defizite in der Fähigkeit Zellen nach DNA-Schädigung in der G1-Phase zu arrestieren [Deng et al., 1995]. Somit scheint p21^{CIP1/WAF1} mit seiner Fähigkeit Zellproliferation zu unterbinden, jedoch DNA-Reparatur zuzulassen, zusätzlich zu einer ihm zugeordneten Rolle bei der Seneszenz alternder Zellen [Noda et al., 1994], ein wichtiger Vermittler der p53 Antwort auf DNA-Schädigung zu sein. Außerdem zeigten Stewart et al. [Stewart et al., 1997], daß p21^{CIP1/WAF1} eine Rolle bei der Differenzierung von Chondrocyten spielen kann. So konnte eine verstärkte p21^{CIP1/WAF1} Expression in postmitotischen Chondrocyten der hypertrophen Zonen in Epiphysenfugen nachgewiesen werden. Die verstärkte p21^{CIP1/WAF1} Expression ging dabei mit einer verstärkten Expression von Kollagen X - einem spezifischen Hypertrophie-Marker in Knorpel - einher.

Die Untersuchung von Knockout-Mausmutanten brachte vor allem für p27^{KIP1}-gendetierte Tiere einen wahrscheinlich durch den Wegfall der inhibitorischen Wirkung bedingten Hang zu Gigantismus mit Vergrößerung diverser Organe durch Hyperplasie wie Extremitäten, Leber, Milz und Gehirn zum Vorschein [Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996]. Auch eine auf die Hirnanhangsdrüse beschränkte Tumorbildung [ibid] und die Verkürzung der Zellzyklen [Durand et al., 1997] unterstützten diese These. Bei p57^{KIP2}-gendetierten Mäusen waren schwerwiegende Entwicklungsdefekte besonders im Bereich des Gastrointestinaltraktes, sowie unterschiedlichste Arten von Fehlbildungen des Skelettes zu beobachten [Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997], die im allgemeinen ebenso wie bei den p27^{KIP1}-gendetierten Tieren auf ein verzögertes Verlassen des Zellzyklus und damit verspätetes Einsetzen der Differenzierung hindeuten. Für eine der in dieser Studie ähnlich beobachteten Hochregulation von p57^{KIP2} bei Differenzierungsprozessen in embryonalen Entwicklungsphasen der Maus - vor allem auch in Knorpelgewebe - gibt es in der Literatur ebenso Hinweise [Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997], wie für eine Hochregulation in postmitotischen Linsen-Faserzellen, die morphologisch stark Chondrocyten ähneln [Gomez Lahoz et al., 1999]. Damit unterstützen diese Untersuchungen, unsere eigenen Ergebnisse der sich verändernden p57^{KIP2}-Expression in Chondrocyten im Verlaufe der sich einem postmitotischen Zustand nähernden Entwicklung.

Eine Erklärung für die Hochregulation von p57^{KIP2} nach Reduktion der Serummitogene kann bei einem anderen Mitglied der CIP/KIP-Familie gefunden werden. Coats et al. (1996) beschreiben für p27^{KIP1}, einem nahen Verwandten von p57^{KIP2} genau diesen Prozeß der Hochregulation nach Serumentzug und einen damit verbundenen - künstlich hervorgerufenen - Proliferationsstop bei 3T3-Mausfibroblasten [Coats et al., 1996]. Somit stehen unsere Ergebnisse in enger Korrelation zu diesen Befunden.

Ein Rückgang der CDK 6-Expression nach Serumentzug ist bisher aus der Literatur nicht bekannt. Die *INK4*-Familie, zu denen auch p16^{INK4a} gehört, trägt ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit die Zyklinabhängigen-Kinasen CDK 4 und CDK 6 zu inhibieren (inhibitor of *CDK4*) [Johnson & Walker, 1999], so daß eventuell CDK 6 hier vermehrt in einem an p16^{INK4a} gebundenen Zustand vorliegt, in dem sie vom Antikörper nicht detektiert werden kann. Jiang et al. (1998) beschreiben im Zusammenhang mit einer Überexpression von p16^{INK4a} in U2OS-Zellkulturlinien eine ähnliche Abnahme freier oder an das komplementäre Zyklin D1 gebundener Zyklinabhängiger-Kinasen des Typs CDK 4 [Jiang et al., 1998]. Da es sich bei der Zyklinabhängigen-Kinase CDK 4 um einen nahen Verwandten der Zyklinabhängigen-Kinase CDK 6 handelt, spielt an dieser Stelle vermutlich derselbe Prozeß einer Bindung an p16^{INK4a} eine Rolle beim Rückgang der detektierbaren CDK 6-Expression. Leider konnte für die Zyklinabhängige-Kinase CDK 6 keine Analyse der RNA-Expression durchgeführt werden, so daß die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen nicht weiter verifiziert werden konnten.

Zusammenfassend zeigen die Daten damit zum ersten mal eine Rolle von p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} bei der Regulation der Proliferation, abhängig von der Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen und Serummitogenen. Weder für p15^{INK4b}, noch für p57^{KIP2} ist bisher eine vergleichbare Rolle in der Literatur beschrieben. Besonders interessant erscheint, daß beide Mechanismen - sowohl der reversible Proliferationsstop durch Serumentzug, als auch der sukzessive Proliferationsstop durch andauernde Subkultivierung und dadurch bedingte Dedifferenzierung der humanen Chondrocyten - mit einer Hochregulation von p15^{INK4b}, und p57^{KIP2} korrelieren. Damit erweisen sich diese beiden Zyklinabhängigen-Kinaseinhibitorproteine als ideale Kandidaten zur Manipulation. Als weiterer Kandidat zur Manipulation des Seneszenz-bedingten Proliferationsrückgangs erwies sich p16^{INK4a}, dem im Allgemeinen schon diese Rolle in der Literatur zugedacht wird.

Die Erstellung von Zellzyklusregulator-Expressionsprofilen von kultivierten humanen Chondrocyten sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene kann einen wesentlichen Beitrag zum näheren Verständnis des Zusammenspiels der einzelnen Regulatoren des Zellzyklus liefern.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stellen nun die Basis für eine weiterführende molekularbiologische Analyse der Möglichkeiten der *in-vitro* Beeinflussung des Proliferationsverhaltens kultivierter humaner Chondrocyten, z.B. durch gezieltes Ausschalten der Expression einzelner identifizierter Regulatoren über Antisense-Oligonukleotide, dar. Ähnlich wie dies bereits für Fibroblastenmodelle gezeigt wurde [Coats et al., 1996], können hier die natürlichen Grenzen der Seneszenz - eines nicht reversiblen altersbedingten Proliferationsstops - oder die durch Serummitogenmangel bedingte Quieszenz - eines reversiblen Eintritts in eine proliferationsfreie Ruhephase - überwunden werden.

Damit schafft diese Studie die Voraussetzungen für die Entwicklung neuer therapeutisch nutzbarer Strategien zur Manipulation der Regeneration unterschiedlichster Gewebetypen *in-vitro*, aber auch *in-vivo*. Es wird sich erweisen, in wie weit das System der kultivierten humanen Chondrocyten diese Art der Beeinflussung zuläßt.

Kapitel 5:

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Herausforderung der klinischen Forschung besteht in der Schaffung einer Alternative für kostspielige und oft aufgrund von Spendermaterialmangel behinderte Organtransplantationen durch *in-vitro* Organogenese. Ein Beispiel für den Mangel an Ersatzgeweben in der Transplantationsmedizin stellt Knorpelgewebe dar, dessen starker Bedarf z.B. bei Schädigungen des Fortbewegungsapparates, aber auch nach Tumorsektionen bisher nicht gedeckt werden kann. Die mangelhafte Regeneration von Knorpelgewebe und bisher nur unzufriedenstellende Generation von künstlichem Knorpelgewebe *in-vitro* ist insbesondere auf die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit von Knorpelzellen (Chondrocyten) in Kultur zurückzuführen. Proliferation und Replikation von Zellsystemen unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, die bei Mammaliern unter anderem von den Proteinfamilien der Zyklone, Zyklonabhängigen-Kinasen, Zyklonabhängigen-Kinaseinhibitoren (CIP/KIP-Familie, INK4-Familie), sowie der Rb-Familie kontrolliert werden. Diese Regulatoren greifen in Proliferations- und Differenzierungsprozesse insbesondere durch die Steuerung des G1/S-Phasen-Übergangs innerhalb des Zellzyklus ein.

Ziel dieser Arbeit war es, in dem einfachen Modellsystem kultivierter humaner Chondrocyten Zellzyklusregulatoren zu identifizieren, die bei der Regulation des Proliferationsverhaltens von humanen Chondrocyten eine Rolle spielen. Der Differenzierungsgrad und das Proliferationsverhalten von humanen Chondrocyten läßt sich *in-vitro* durch unterschiedliche Dauer der Subkultivierung (Passagenzahl) und unterschiedliche Kulturbedingungen beeinflussen.

Das Expressionsmuster der Zyklone, der Zyklonabhängigen-Kinasen und deren Inhibitoren, sowie der Rb-Familie wurde auf Protein- und RNA-Ebene in humanen Chondrocyten unterschiedlicher Kulturpassagen, sowie unter unterschiedlichen Kulturbedingungen untersucht.

Es konnten differenzierungsabhängige Unterschiede in der Expression der Zyklonabhängigen-Kinaseinhibitoren der INK4-Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}) und der CIP/KIP-Familie (p57^{KIP2}) gezeigt werden, die sich in einer Zunahme der Expression dieser Inhibitorproteine von frühen (Passage 2) zu späten (Passage 8) Kulturpassagen, sowie bei Entzug von Serummitogenen manifestierten. Interessanterweise gehen beide Phänomene (Zunahme der Kulturpassagenzahl und Entzug von Serummitogenen) mit einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit der humanen Chondrocyten einher. Das heißt, die reduzierte Proliferationsfähigkeit könnte durch die Hochregulation dieser Zellzyklusregulatoren bedingt sein. Diese Ergebnisse zeigen damit zum ersten Mal, daß die Zyklonabhängigen-Kinaseinhibitoren p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p57^{KIP2} eine Rolle bei der Kontrolle des Differenzierungsgrades und des Proliferationsverhaltens humaner Chondrocyten einnehmen könnten.

Aufgrund dieser Erkenntnisse können sich in Zukunft therapeutisch nutzbare Strategien entwickeln lassen, die z.B. über die Manipulation der Expressionsrate dieser Faktoren Einfluß auf die Proliferation *in-vitro* und eventuell auch *in-vivo* nehmen. Dadurch erscheint es möglich, daß in absehbarer Zeit die natürlichen Grenzen der Seneszenz oder Quieszenz humaner Chondrocyten zum Zweck der therapeutisch nutzbaren *in-vitro* Organogenese überwunden werden.

Kapitel 6:

LITERATUR

- Afshari, C.A., M.A. Nichols, Y. Xiong and M. Mudryj, *A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts*, Cell Growth Differ, 1996. **7**(8): p. 979-988.
- Afshari, C.A., P.J. Vojta, L.A. Annab, P.A. Futreal, T.B. Willard and J.C. Barrett, *Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence*, Exp Cell Res, 1993. **209**(2): p. 231-237.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. Watson, eds., *Molekularbiologie der Zelle*, 3rd ed., 1995. VCH: Weinheim.
- Alcorta, D.A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach and J.C. Barrett, *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13742-13747.
- Atadja, P., H. Wong, I. Garkavtsev, C. Veillette and K. Riabowol, *Increased activity of p53 in senescing fibroblasts*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8348-8352.
- Benya, P.D., S. Padilla and M.E. Ninni, *Independent regulation of collagen types of chondrocytes during the loss of differentiated function in culture*, Cell, 1978. **15**: p. 1313-1321.
- Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cell*, Science, 1998. **279**(5349): p. 349-352.
- Campisi, J., *The biology of replicative senescence*, Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 703-709.
- Chan, F.K., J. Zhang, L. Cheng, D.N. Shapiro and A. Winoto, *Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4*, Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2682-2688.
- Chiu, C.P. and C.B. Harley, *Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase*, Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **214**(2): p. 99-106.
- Coats, S., W.M. Flanagan, J. Nourse and J.M. Roberts, *Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle*, Science, 1996. **272**(5263): p. 877-880.
- Cobrinik, D., et al., *Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development*, Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1633-1644.
- Cristofalo, V.J. and R.J. Pignolo, *Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture*, Physiol Rev, 1993. **73**(3): p. 617-638.
- Deng, C., P. Zhang, J.W. Harper, S.J. Elledge and P. Leder, *Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control*, Cell, 1995. **82**(4): p. 675-684.
- Dulic, V., W.K. Kaufmann, S.J. Wilson, T.D. Tlsty, E. Lees, J.W. Harper, S.J. Elledge and S.I. Reed, *p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest*, Cell, 1994. **76**(6): p. 1013-1023.

-
- Durand, B., F.B. Gao and M. Raff, *Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation*, *Embo J*, 1997. **16**(2): p. 306-317.
- el Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*, *Cell*, 1993. **75**(4): p. 817-825.
- Engvist, O. and S.H. Johnsson, *Perichondrial arthroplasty*, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 1980. **14**: p. 71-87.
- Fero, M.L., et al., *A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice*, *Cell*, 1996. **85**(5): p. 733-744.
- Freed, L.E., A.P. Hollander, I. Martin, J.R. Barry, R. Langer and G. Vunjak-Novakovic, *Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system*, *Exp Cell Res*, 1998. **240**(1): p. 58-65 Issn: 0014-4827.
- Freed, L.E. and G. Vunjak-Novakovic, *Microgravity tissue engineering*, *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*, 1997. **33** (5): p. 381-385.
- Gomez Lahoz, E., et al., *Cyclin D- and E-dependent kinases and the p57(KIP2) inhibitor: cooperative interactions in vivo*, *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 353-363.
- Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*, *Cell*, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 405-413.
- Griffith, L.G., B. Wu, M.J. Cima, M.J. Powers, B. Chaignaud and J.P. Vacanti, *In vitro organogenesis of liver tissue*, *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **831**: p. 382-397.
- Gu, Y., C.W. Turck and D.O. Morgan, *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit*, *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 707-710.
- Guan, K.L., C.W. Jenkins, Y. Li, M.A. Nichols, X. Wu, C.L. O'Keefe, A.G. Matera and Y. Xiong, *Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function*, *Genes Dev*, 1994. **8**(24): p. 2939-2952.
- Halevy, O., B.G. Novitch, D.B. Spicer, S.X. Skapek, J. Rhee, G.J. Hannon, D. Beach and A.B. Lassar, *Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD*, *Science*, 1995. **267**(5200): p. 1018-1021.
- Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*, *Nature*, 1994. **371**(6494): p. 257-261.
- Hara, E., R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone and G. Peters, *Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence*, *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 859-867.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S.J. Elledge, *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*, *Cell*, 1993. **75**(4): p. 805-816.
- Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid strains*, *Exp. Cell Res.*, 1961. **25**: p. 585-621.
-

- Hirai, H., M.F. Roussel, J.Y. Kato, R.A. Ashmun and C.J. Sherr, *Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6*, Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2672-2681.
- Holtzer, H., J. Abbott, J. Lash and S. Holtzer, *The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1960. **46**: p. 1533-1542.
- Hubbel, J.A., *Biomaterials in Tissue Engineering*, Biotechnology, 1995. **13**: p. 565-576.
- Jiang, H., H.S. Chou and L. Zhu, *Requirement of cyclin E-Cdk2 inhibition in p16(INK4a)-mediated growth suppression*, Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5284-5290.
- Johnson, D.G. and C.L. Walker, *Cyclins and cell cycle checkpoints*, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 295-312.
- Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. 4th ed. 1996, Berlin, Heidelberg: Springer. 758.
- Kiyokawa, H., et al., *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)*, Cell, 1996. **85**(5): p. 721-732.
- Kulju, K.S. and J.M. Lehman, *Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts*, Exp Cell Res, 1995. **217**(2): p. 336-345.
- Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*, Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
- Langer, R., G. Vunjak, L. Freed, A. Atala, C. Vacanti and J. Vacanti, *Tissue engineering: biomedical applications*, Tissue Engineering, 1995. **1**: p. 151-162.
- Larsson, O., C. Latham, P. Zickert and A. Zetterberg, *Cell cycle regulation of human diploid fibroblasts: possible mechanisms of platelet-derived growth factor*, J Cell Physiol, 1989. **139**(3): p. 477-483.
- Lee, M.H., I. Reynisdottir and J. Massague, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution*, Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 639-649.
- Matsuoka, S., M.C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J.W. Harper and S.J. Elledge, *p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene*, Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 650-662.
- Mayne, R., M. Vail, P.M. Mayne and E.J. Miller, *Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**: p. 1674-1678.
- Minuth, W.W., M. Sittinger and S. Kloth, *Tissue engineering: Herstellung von künstlichen Geweben für die Biomedizin*, Bioscope, 1996. **10**: p. 36-41.
- Mitchinson, J.M., *The biology of the cell cycle*. 1971, London: Cambridge University Press.

-
- Mittnacht, S., *Control of pRB phosphorylation*, Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(1): p. 21-27.
- Morgan, D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*, Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 261-291.
- Morse, L., D. Chen, D. Franklin, Y. Xiong and S. Chen Kiang, *Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6*, Immunity, 1997. **6**(1): p. 47-56.
- Murray, A. and T. Hunt, *The cell cycle: an introduction*. 1993, New York: Freeman.
- Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii and D.Y. Loh, *Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors*, Cell, 1996. **85**(5): p. 707-720.
- Noda, A., Y. Ning, S.F. Venable, O.M. Pereira Smith and J.R. Smith, *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*, Exp Cell Res, 1994. **211**(1): p. 90-98.
- Nurse, P., *Genetic control of cell size at cell division in yeast*, Nature, 1975. **256**: p. 547-551.
- Ohlsen, L., *Cartilage formation from free perichondrial grafts, an experimental study in rabbits*, Br. J. Plast. Surg., 1976. **29**: p. 262-267.
- Pagano, M., ed., *Cell cycle control*, Vol. 22. (Henning, W., L. Nover and U. Scherer ed., *Results and Problems in Cell Differentiation*), 1998. Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- Palmero, I., B. McConnell, D. Parry, S. Brookes, E. Hara, S. Bates, P. Jat and G. Peters, *Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status*, Oncogene, 1997. **15**(5): p. 495-503.
- Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*, Science, 1989. **264**: p. 603-608.
- Polyak, K., J.Y. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massague, J.M. Roberts and A. Koff, *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*, Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
- Polyak, K., M.H. Lee, H. Erdjument Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst and J. Massague, *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*, Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
- Reynisdottir, I. and J. Massague, *The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2*, Genes Dev, 1997. **11**(4): p. 492-503.
- Reynisdottir, I., K. Polyak, A. Iavarone and J. Massague, *Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta*, Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1831-1845.
- Ruas, M. and G. Peters, *The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives*, Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(2): p. F115-177.
-

- Serrano, M., *The tumor suppressor protein p16INK4a*, Exp Cell Res, 1997b. **237**(1): p. 7-13.
- Serrano, M., G.J. Hannon and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*, Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-707.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach and S.W. Lowe, *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*, Cell, 1997a. **88**(5): p. 593-602.
- Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*, Cell, 1993. **73**: p. 1059-1065.
- Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*, Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-1512.
- Skoog, T., L. Ohlsen and S.A. Sohn, *Perichondrial potential for cartilagenous regeneration*, Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 1972. **6**: p. 123-125.
- Soos, T.J., M. Park, H. Kiyokawa and A. Koff, *Regulation of the cell cycle by CDK inhibitors*. In: Cell Cycle Control Vol. 22, Pagano, M., ed. (Results and Problems in Cell Differentiation, Hennig, W., L. Nover and U. Scheer, eds.), 1998. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 111-128.
- Stein, G.H., L.F. Drullinger, A. Soulard and V. Dulic, *Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts*, Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2109-2117.
- Stein, G.H. and V. Dulic, *Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts*, Bioessays, 1995. **17**(6): p. 537-543.
- Stein, G.H. and V. Dulic, *Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest*, J Investig Dermatol Symp Proc, 1998. **3**(1): p. 14-18.
- Stein, G.H., M. Namba and C.M. Corsaro, *Relationship of finite proliferative lifespan, senescence and quiescence in human cells*, J. Cell. Physiol., 1985. **122**: p. 343-349.
- Stewart, M.C., C.E. Farnum and J.N. MacLeod, *Expression of p21CIP1/WAF1 in chondrocytes*, Calcif Tissue Int, 1997. **61**(3): p. 199-204.
- Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*, Cell, 1994. **78**(1): p. 67-74.
- van der Rest, M. and R. Garrone, *Collagen family of proteins*, Faseb J, 1991. **5**(13): p. 2814-2823.
- Van Zant, G. and G. de Haan, *Genetic control of lifespan: studies from animal models*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 1999: p. 1-12.
- Vaziri, H. and S. Benchimol, *From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging*, Exp Gerontol, 1996. **31**(1-2): p. 295-301.

- von der Mark, K., V. Gaus, H. von der Mark and P. Müller, *Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture*, Nature, 1977. **267**: p. 531-532.
- Wynford Thomas, D., *Telomeres, p53 and cellular senescence*, Oncol Res, 1996. **8**(10-11): p. 387-398.
- Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach, *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*, Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-704.
- Yan, Y., J. Frisen, M.H. Lee, J. Massague and M. Barbacid, *Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development*, Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 973-983.
- Zetterberg, A. and O. Larsson, *Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation of quiescent Swiss 3T3 cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**: p. 5365-5369.
- Zhang, P., et al., *Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome*, Nature, 1997. **387**(6629): p. 151-158.
- Zindy, F., D.E. Quelle, M.F. Roussel and C.J. Sherr, *Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging*, Oncogene, 1997. **15**(2): p. 203-211.

Danksagung

Für die Möglichkeit in modernen, mit "State-of-the-Art" Technologie ausgestatteten Labors innerhalb der HNO-Klinik der Universität Tübingen eine naturwissenschaftliche Promotionsarbeit anfertigen zu können, danke ich vor allem dem ärztlichen Direktor **Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner**.

Für die Überlassung des Themas sowie für weiterführender Anregungen danke ich Herrn **Dr. H. Löwenheim**.

Herrn **Prof. Dr. D. Ammermann** der biologischen Fakultät der Universität Tübingen danke ich für Erstellung des Zweitgutachtens, sowie für das allzeit freundliche Entgegenkommen bei der Planung des Prüfungstermins.

Frau **Dr. K. Gültig** möchte ich an dieser Stelle nochmals herzlich für die Einführung in die benötigten Techniken danken, sowie auch für ihre Unterstützung bei der Diskussion von Problemen, für die sie jederzeit zugänglich war.

Frau **Andrea Müller** möchte ich herzlich danken für die Anfertigung der RPAs, sowie natürlich für das nette "Zusammenleben und -arbeiten" in Raum 116.

Frau **Dr. Nicole Müschenborn** für die allzeit nette und hilfreiche Zusammenarbeit in Knorpelfragen.

Den Mitarbeitern der Firma Otogene, die mir mit fachmännischen Tips, aber auch mit Materialien geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle nicht vergessen. Besonders hervorzuheben sind dabei Herr **Dr. H. Hahn**, Frau **Dipl. Biol. C. Irrle**, Herr **Dipl. Biol. J. Schuck** und Herr **Dr. R. Stratmann**.

Genannt sein sollen hier auch die zahlreichen Mitarbeiter der Hörforschungslabors der HNO-Klinik Tübingen, die mich in unterschiedlichster Weise unterstützt haben: Frau **Dipl. Biol. E. Babini**, Frau **L. Bäßler**, Herr **Dipl. Biol. T. Beiter**, Frau **V. Beitlich**, Frau **A. Braun**, Frau **Dipl. Biol. B. Breitingner**, Herr **W. Burkhard**, Frau **Dr. J. Engel**, Herr **Dipl. Biol. S. Fink**, Frau **H.-S. Geisler**, Herr **Dr. S. Gründer**, Frau **S. Kasperek**, Frau **T. Katz**, Frau **I. Köpschall**, Herr **Dr. M. Langer**, Frau **Dipl. Biol. P. Langer**, Frau **Dr. A. Limberger**, Herr **Dipl. Ing. K. Löffler**, Herr **M. Michna**, Herr **Dr. S. Münkner**, Frau **Dr. J. Ngo Anh**, Herr **M. Paukert**, Herr **Dr. M. Pfister**, Herr **Dr. M. Praetorius**, Herr **Dipl. Phys. U. Rexhausen**, Frau **P. Rilling**, Frau **K. Rohbock**, Herr **Dr. A. Rüsich**, Herr **Dr. N. Waka**, Herr **Dipl. Biol. T. Weber**, Herr **Dipl. Biol. H. Winter**, Frau **Dr. U. Zimmermann**.

Auch bei all meinen Freunden und Bekannten, die mich während der Zeit dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich bedanken, besonders aber bei Herrn **Dipl. Biol. Jörg Götz** und Herrn **Dr. Felix Vogel**, die mir durch täglichen "Rat und Tat" die Arbeit sehr erleichtert haben.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank aber Frau **PD Dr. M. Knipper** für ihre exzellente Betreuung und die Erstellung des Gutachtens. Hauptsächlich ihrer Unterstützung ist es zu verdanken, daß ich diese Arbeit in der mir zur Verfügung stehenden Zeit erfolgreich beenden konnte. Auch halfen mir ihre konstruktive Kritik und die zahlreichen anregenden Diskussion dieser Arbeit "wissenschaftliches Leben" einzuhauchen.

Zuguterletzt möchte ich natürlich noch meiner Familie, besonders aber meiner Frau Claudia für die seelische und moralische Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Name: Joachim Wolfgang Reichl

geboren: 22.11.1970 in Sindelfingen

Familienstand: verheiratet seit 14.03.1998

Schulbildung: 1977 - 1981 Grundschule Weil im Schönbuch
1981 - 1990 Schönbuch-Gymnasium Holzgerlingen

Studium: 1992 - 1997 Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien; Biologie und Englisch, Universität Tübingen
1997 Staatsexamensarbeit mit dem Thema: "Die Ultrastruktur des heterotrichen Faulschlammciliaten *Metopus es*"

Beschäftigungsverhältnisse: Juni - Oktober 1990 Aushilfstätigkeit IBM Deutschland
1990 - 1992 Zivildienst als Rettungsassistent bei DRK Sindelfingen
März bis Oktober 1992 Aushilfstätigkeit Hewlett-Packard GmbH
Oktober bis November 1997 Aushilfstätigkeit als wissenschaftl. Hilfskraft in der klinischen Forschergruppe der HNO-Tübingen

Promotion: 1997 - 2000 Anfertigung einer Promotionsarbeit unter Frau PD Dr. Knipper und Herr Prof. Dr. Ammermann in der klinischen Forschergruppe der HNO-Tübingen (Ärztl. Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner) mit dem Thema: "Expressionsanalyse der Zellzyklusregulatorproteine der Zyklin-, CDK-, CDKI- und Rb-Familie in humanen Chondrocyten *in-vitro* in Abhängigkeit von Proliferation und Differenzierung"

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Joachim Reichl

Käsenbachstr. 18/1

72076 Tübingen

