

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik  
(Prof. Dr. R. Bürgers)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Die entzündungsmodulierenden Eigenschaften von Adiponektin  
und Leptin und deren Wirkung auf chondrogene Progenitorzellen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Inga Johannsen

aus

Leer

Göttingen 2015



Dekan: **Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

I. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. N. Miosge**

II. Berichterstatter/in: **PD Dr. F. Czepluch**

III. Berichterstatter/in: **Prof. Dr. M. Schön**

Tag der mündlichen Prüfung: **13.04.2016**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zusammenhänge zwischen Adipositas und Gelenkerkrankungen</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Osteoarthrose und rheumatoide Arthritis - Epidemiologie, Pathophysiologie und deren Erscheinungsformen</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Veränderungen des Knorpelgewebes im Rahmen von Gelenkerkrankungen</b>	<b>5</b>
1.3.1 Aufbau und Funktion des Knorpelgewebes	5
1.3.2 Subklinische Entzündungen als Auslöser der Knorpeldegradation	8
<b>1.4 Therapeutische Behandlungsansätze</b>	<b>11</b>
1.4.1 Bisherige Leitlinientherapie	11
1.4.2 Chondrogene Progenitorzellen	14
<b>1.5 Das Fettgewebe</b>	<b>15</b>
1.5.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ	16
1.5.2 Adiponektin als potentiell anti-inflammatorisches Adipozytokin	17
1.5.3 Leptin als pro-inflammatorisches Adipozytokin	18
<b>1.6 Entwicklung des Dissertationsthemas</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>21</b>
2.1.1 Medium	21
2.1.2 Puffer und Lösungen	21

2.1.3	Chemikalien	24
2.1.4	Reagenziensätze und Kits	25
2.1.5	Membranen und Fotochemikalien	25
2.1.6	Antikörper	26
2.1.7	Stimulationsproteine	27
2.1.8	Primerliste	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.2	Immunfluoreszenz	32
2.2.3	RNA-Isolation aus primären Zellen	35
2.2.4	Synthese von cDNA	37
2.2.5	Allgemeines zur PCR	38
2.2.6	Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen - Pfaffl	42
2.2.7	Primerdesign	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Darstellung der immunzytochemischen Untersuchungen</b>	<b>46</b>
3.1.1	Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs	47
3.1.2	Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs	49
3.1.3	Immunzytochemische Darstellung von Adiponektin in CPCs	52
3.1.4	Immunzytochemische Darstellung von Leptin in CPCs	55
<b>3.2</b>	<b>Darstellung der Genexpressionsanalysen</b>	<b>58</b>
3.2.1	Kontrolle der RNA-Integrität als Vorbereitung der Genexpressionsuntersuchungen	59
3.2.2	Genexpressionveränderungen nach Stimulationsversuchen mit Adiponektin	61
3.2.3	Genexpressionsveränderungen nach Stimulationsversuchen mit Leptin	63

3.2.4	Tabellarische Zusammenfassung der Genexpressionsveränderungen nach Adipozytokinstimulation	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1	Erörterung der immunzytochemischen Untersuchungen	70
4.2	Diskussion der Expression von Adiponektin- und Leptinrezeptoren im Knorpelgewebe	71
4.3	Diskussion des Vorkommens der Adipozytokine Adiponektin und Leptin im Knorpelgewebe	74
4.4	Diskussion der Stimulationsversuche der CPCs mit Adiponektin und Leptin	79
4.5	Diskussion der Genexpressionsveränderungen	83
4.6	Klinische Relevanz der Ergebnisse und therapeutische Ausblicke	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>94</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis	94
6.2	Tabellenverzeichnis	96
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
AK	Antikörper
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>

cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CPC	<i>Chondrogenic Progenitor Cell</i>
DAPI	fluoreszierender DNA-Farbstoff
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Deckglas
DMARDs	<i>Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs</i>
DMEM	<i>Dulbecco' s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	<i>Extracellular Martrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
hTERT	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>

MG	Molekulargewicht
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOLCI	<i>Molecular and Optical Live Cell Imaging</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor „kappa light chain enhancer “ of activated B-cells</i>
OA	Osteoarthrose
Ob-R	<i>obese-Rezeptor/Leptin-Rezeptor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SOX9	<i>sex determining region Y – box 9</i>
SYBR-Green	Fluoreszenzfarbstoff
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline and Tween</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
WHO	<i>World Health Organization</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Zusammenhänge zwischen Adipositas und Gelenkerkrankungen

2008 gründete die Bundesregierung „IN FORM“, eine Initiative für gesunde Ernährung und mehr Bewegung in der Bevölkerung. Der Aktionsplan hat das Ziel, die Menschen zu einem gesünderen Lebensstil zu motivieren und somit die Ausgaben des Gesundheitssystems zu reduzieren. Bislang gibt es 37 Millionen übergewichtige Bundesbürger. Übergewicht und Adipositas sind eine immer stärker werdende gesundheitliche Bedrohung. Vor allem in den Industrienationen führt ein ungesunder Lebensstil zu zahlreichen Wohlstandserkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Stoffwechselstörungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Laut eines Berichts der WHO aus dem Jahr 2000 ist Adipositas inzwischen zu einem so stark wachsenden Gesundheitsrisiko geworden, dass sogar die traditionellen Probleme wie Unterernährung und Infektionskrankheiten in den Schatten gestellt werden (WHO 2000).

Osteoarthrose ist ebenfalls eine durch Übergewicht verursachte Erkrankung. Auf dem „Joint German Congress of Orthopaedics and Trauma Surgery“, der 2006 in Berlin stattfand, wurde eine Metaanalyse publizierter Studien veröffentlicht, welche die eindeutigen Wechselwirkungen zwischen Adipositas und der Entstehung degenerativer Gelenkerkrankungen belegt. Dabei sind nicht nur die Gewicht-tragenden Gelenke wie Hüft-, Knie- und Fussgelenke betroffen, sondern auch die Hand- und Fingergelenke (Oliveria et al.

1999). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Knorpeldegradation nicht nur durch eine mechanische Überbelastung bedingt ist. Vielmehr spielt auch die systemische Freisetzung metabolischer Faktoren eine bedeutende Rolle in der Krankheitsentwicklung.

Das Fettgewebe ist im menschlichen Körper allgegenwärtig. Es dient als Speicherfett, zur Wärmeisolation und als mechanischer Schutz. Studien zeigen nun, dass dieses zusätzlich zu den oben genannten Funktionen als immunologisches, endokrines und parakrines Organ fungiert. Man geht davon aus, dass die Fettzellen, auch Adipozyten genannt, ebenfalls in der Lage sind, sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Moleküle zu produzieren und freizusetzen. Diese Mediatorproteine werden unter dem Begriff „Adipozytokine“ zusammengefasst (Fantuzzi 2005). Das Zusammenspiel von Komplementfaktoren, Wachstumsfaktoren und den Adipozytokinen bedingt eine komplexe Interaktion zwischen dem Fettgewebe und den entzündeten Gelenken (Ehling et al. 2006).

## **1.2 Osteoarthrose und rheumatoide Arthritis - Epidemiologie, Pathophysiologie und deren Erscheinungsformen**

Osteoarthrose (OA) und rheumatoide Arthritis (RA) gelten als zwei der meist verbreiteten Gelenkerkrankungen in den Industrienationen. Weltweit leiden etwa 100 Millionen Menschen unter degenerativ bedingten Rückenschmerzen, OA und RA. Der Krankheitsverlauf ist meist progressiv, in fortgeschrittenem Stadium mit starken Schmerzen assoziiert und führt bereits nach we-

nigen Jahren zu musculoskeletalen Funktionseinbußen. Dies hat nicht nur einen großen Einfluss auf die Sozialstrukturen, sondern bedingt durch die erhöhte Bevölkerungsmorbidität, auch einen starken Anstieg der Behandlungskosten in den Gesundheitssystemen der westlichen Länder (Hunter et al. 2014). Momentan betragen diese 200 Milliarden US-Dollar pro Jahr (Ma et al. 2014).

OA ist eine degenerative Gelenkerkrankung, deren Progression hauptsächlich durch den Grad der pathologischen Veränderungen des Gelenkknorpels bestimmt wird. Durch eine Fehlbelastung des Gelenks kommt es zu einer Schädigung der Knorpelzellen, die mit einer Gefäßeinsprossung aus dem subchondralen Knochen einhergeht. Ebenso ist eine fortschreitende Kalzifikation des Knorpelgewebes mit Verschiebung der Mineralisierungsfront, auch *Tidemark* genannt, festzustellen (Houard et al. 2013). Die Degradation der hyalinen Knorpelstruktur und die darauf folgende Bildung funktionell minderwertigen Faserknorpels sowie das Auftreten subchondraler osteophytärer Veränderungen sind typische Kennzeichen für den progressiven Verlauf der OA.

Die Wahrscheinlichkeit, an OA zu erkranken, nimmt mit steigendem Alter zu. Als häufigste Manifestationsorte der Erkrankung gelten die Knie- und Hüftgelenke, die Fingergelenke sowie die Gelenke der Lumbosakralregion. Nach Schätzungsangaben der WHO leiden nach Erreichen des 60. Lebensjahres 9,6 % aller Männer und 18,0 % der Frauen weltweit unter einer symptomati-

schen OA. 80 % der OA-Patienten klagen über Bewegungseinschränkungen, während 25 % der Erkrankten bereits arbeitsunfähig sind (Woolf und Pfleger 2003). Man unterscheidet die primäre, idiopathische Arthrose, die ohne erkennbare Ursache und meist durch genetische Faktoren bedingt auftritt, von der sekundären Arthrose, welche sich nach Traumata oder aufgrund von Fehlstellungen, Adipositas und Überbelastung manifestiert (Lee et al. 1974). Die ersten Symptome sind Anlauf-, Ermüdungs- und Belastungsschmerzen, gefolgt von Nacht- und Dauerschmerzen sowie Bewegungseinschränkungen. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf kommt es dann zu Gelenksverdickung, Deformierung, Muskelatrophie und Muskelkontrakturen (Hunter und Felson 2006). Ist das Gelenk entzündet, spricht man von aktiver Arthrose. In diesem Fall ist das Gelenk überwärmt, oft druckschmerzhaft und bei auftretendem Gelenkerguss zusätzlich geschwollen.

Die RA ist eine autoimmun bedingte chronische Systemerkrankung, welche sich in der Regel als Polyarthritits manifestiert. In diesem Fall sind sowohl die Gelenke als auch das umgebende Gewebe, die Muskeln und die Sehnen betroffen (Feldmann et al. 1996). Die Erkrankung tritt gehäuft zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. Durch die Einwanderung fehlgesteuerter Immunzellen in das Knorpelgewebe kommt es zu einem Entzündungsprozess, der zur Bildung eines Gewebe-Pannus an der Gelenkinnenhaut führt (Chen et al. 2013). Dieser Tumor-ähnliche Pannus bedingt daraufhin durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme und eine aggressive Gewebeeinfiltration

die Destruktion von Knorpel und Knochen. Das Resultat dieses Entzündungsprozesses sind fortschreitende Gelenksdeformierungen mit einhergehenden Bewegungsschmerzen. Die diagnostischen Kriterien des American College of Rheumatology, die für ein Vorliegen der Krankheit sprechen, sind Morgensteifigkeit, Gelenkschwellung, Arthritis der Hand-und/oder Finger-gelenke, symmetrischer Gelenkbefall, auftretende Rheumaknoten, der Nachweis von Rheumafaktoren im Serum und gelenknahe Osteoporose oder Erosionen im Röntgenbild.

Laut Angaben der WHO liegt die Prävalenz der Erkrankung zur Zeit zwischen 0,3 % und 1,0 %. Menschen aus Industrienationen, insbesondere Frauen, sind am häufigsten betroffen. Durch den fortschreitenden Krankheitsverlauf sind zehn Jahre nach Krankheitsbeginn bereits 50 % der Patienten aufgrund körperlicher Funktionseinbußen nicht mehr in der Lage, am Arbeitsleben teilzunehmen. Die Anzahl der Patienten mit RA nimmt mit 5-50 auf 100.000 Neuerkrankungen pro Jahr stetig zu (Scott et al. 2010).

### **1.3 Veränderungen des Knorpelgewebes im Rahmen von Gelenkerkrankungen**

#### **1.3.1 Aufbau und Funktion des Knorpelgewebes**

Der Gelenkknorpel ist ein Stützgewebe. Er besteht meist aus hyalinem Knorpel, der hauptsächlich aus Kollagen Typ II, IX, XI und einer Interzellularsubstanz gebildet wird. Diese verleiht dem Gewebe eine hohe Druck- und

Zugfestigkeit (Poole 1997). Zum Schutz der Gelenkflächen überzieht der Gelenkknorpel die Enden miteinander artikulierender Knochen. Die Oberfläche des Knorpelgewebes ist mit Gelenkflüssigkeit (Synovia) bedeckt, die der Ernährung der Knorpelzellen (Chondrozyten) dient und gleichzeitig eine reibungsfreie Beweglichkeit der Gelenke ermöglicht (Tamer 2013). Das Knorpelgewebe besteht aus einer zellulären Komponente, den Chondrozyten, die in eine extrazelluläre Matrix (ECM) aus Wasser (70 %), Proteoglykanen und Hyaluronsäure eingebettet sind. In gesundem Zustand ist das Gewebe frei von Nerven und Gefäßen. Aufgrund der Avaskularität des Knorpelgewebes erhalten die Chondrozyten sowohl Sauerstoff als auch Nährstoffe über Transporter oder freie Diffusion aus der Gelenkkapsel, der Synovialflüssigkeit und dem subchondralen Knochen (Villalvilla et al. 2013, Wang et al. 2013). Die Zellen sind an diese hypoxische Umgebung angepasst. Studien zeigen, dass das hypoxische Milieu sogar protektiv wirkt und im Tierversuch zu einer geringeren Freisetzung Matrix-abbauender Enzyme führt. Außerdem bewirken hypoxische Bedingungen im Vergleich zur Normoxie eine gesteigerte Produktion von Kollagen II und dem Proteoglykan Aggrecan (Strobel et al. 2010). Nichtsdestotrotz liegt die Halbwertszeit von Aggrecan bei 120 Tagen, während die Halbwertszeit des Kollagen II sogar bei 120 Jahren liegt (Houard et al. 2013). Ein Grund für diese langen Halbwertszeiten ist der herabgesetzte Stoffwechsel gesunder Chondrozyten, welche, sobald sie

ausdifferenziert sind, in einen postmitotischen Ruhezustand verfallen (Nilsson et al. 2007).

Obwohl das Knorpelgewebe eine einfache Struktur aufweist, ist es dennoch ein sehr komplexes Gewebe, das sich, den verschiedenen Regionen entsprechend, durch unterschiedliche Matrixzusammensetzung, Organisation und Genexpression auszeichnet (Grogan et al. 2014). Das Knorpelgewebe wird in vier Zonen unterteilt. Die superfizielle Zone besteht aus gekreuzt verlaufenden Kollagenfibrillen sowie einem hohen Gehalt an Decorin und einem entsprechend geringeren Gehalt an Aggrecan (Poole et al. 1996). Die Chondrozyten dieser Knorpelregion sind klein und abgeflacht (Hunziker et al. 2002). Darauf folgt die mittlere Zone, in welcher die Kollagenfibrillen etwas dicker sind und strahlenförmig verlaufen. Die Chondrozyten sind in diesem Bereich nicht mehr flach, sondern rundlich (Youn et al. 2006). An dritter Stelle liegt die tiefe, radiäre Zone. Auch hier verlaufen die Kollagenfibrillen strahlenförmig. Die Bündel sind jedoch dicker als zuvor in der mittleren Zone. Sie umgeben die Chondrozyten, die nicht mehr frei im Gewebe verteilt sind, sondern in Säulen- oder Nester-Form gruppiert vorliegen (Kouri et al. 1996). Als letztes folgt die mineralisierte Zone. Diese befindet sich direkt unterhalb der *Tidemark*, der Mineralisierungsfront des Knorpels, und oberhalb des subchondralen Knochens. Die *Tidemark* bleibt auch nach Verschluss der Wachstumsfugen bestehen und fungiert fortan als mechanischer Puffer zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Knorpel (Lyons et al. 2006).

Von der superfiziellen Zone bis hin zur mineralisierten Zone nimmt die Zelldichte von oben nach unten hin ab, während der Gehalt an Proteoglykanen entsprechend ansteigt. Das Kollagennetzwerk der interzellulären Matrix ist für die Zugfestigkeit verantwortlich. Die Druckfestigkeit des hyalinen Knorpels wird durch den hohen Anteil an Aggrecan gewährleistet (Poole et al. 2001). Diese räumliche Matrixorganisation ermöglicht die Absorption und Dämpfung äußerer mechanischer Krafteinwirkungen. Trotz allem ist die mechanische Last sehr wichtig für die Stoffwechsellhomöostase, da diese die Diffusion und Nährstoffverteilung im Knorpelgewebe anregt. Studien belegen, dass eine längerfristige Immobilisation das Entstehen von Gelenkschäden begünstigt (Buckwalter und Mankin 1998). Im Gegensatz dazu soll Bewegung den Proteasenanstieg und einen damit einhergehenden Knorpelabbau verhindern.

In-vitro-Experiment zeigte, dass leichte zyklische mechanische Belastung einer durch IL1 und TNF $\alpha$  induzierten Entzündung mit kataboler Stoffwechselantwort der Chondrozyten entgegenwirken kann (Leong et al. 2011).

### **1.3.2 Subklinische Entzündungen als Auslöser der Knorpeldegradation**

Im Rahmen der Gelenkerkrankungen wird die Krankheitsprogression durch den Grad der Knorpeldegradation entscheidend beeinflusst. Diese Tatsache trifft sowohl in Bezug auf die OA als auch hinsichtlich der RA zu. Die Auslö-

ser für diesen Prozess können sehr vielfältig sein, wie zum Beispiel eine genetische Prädisposition, immunologische Prozesse, Traumata, metabolische Erkrankungen oder der mit dem Alter einhergehende Gelenkverschleiß. Allen Faktoren gemeinsam ist jedoch ein Ungleichgewicht im Stoffwechselmechanismus der Chondrozyten des betreffenden Gelenkknorpels. Diese Dysbalance hat eine gesteigerte Expression und eine vermehrte Aktivität proteolytischer Enzyme zur Folge (Nagase und Kashiwagi 2003). Zytokine, Chemokine, Adipokine und viele weitere Mediatoren führen zur Induktion intrazellulärer Signalwege, die im Zusammenspiel mit den umgebenden Strukturen zu einer subklinischen lokalen oder systemischen Entzündung führen (Malemud 2010).

Im Verlauf dieser Arbeit wird im Folgenden diskutiert werden, inwiefern diese Entzündungsreaktionen für den Abbau und die Zerstörung des Gelenkknorpels verantwortlich sind.

Wie bereits unter 1.1.1 beschrieben, wurde die OA lange zu den rein degenerativen Gelenkerkrankungen gezählt. Trotz allem kommt es auch in den durch OA veränderten Gelenken zu Entzündungsreaktionen (Kobayashi et al. 2005). Während man im Rahmen der RA von einer immunologisch bedingten chronischen Entzündung als Ursache der Gelenkdeformation ausgeht, führt im Fall der OA eine Reizung des Gelenkknorpels durch mechanische Überbelastung, oxidativen Stress und andere inflammatorische Mediatoren ebenfalls zu Entzündungsreaktionen (Loeser 2008).

Im Gegensatz zur RA manifestiert sich die Gelenkentzündung, die im Krankheitsverlauf der OA auftritt, in der Regel nicht systemisch. Allgemeine Entzündungszeichen wie Gelenkschmerz und eine sichtbare Schwellung des Gelenks sind jedoch vorhanden. Im frühen Krankheitsverlauf ist auch eine intraartikuläre Entzündung im Rahmen einer Synovitis nachzuweisen (Ghosh und Cheras 2001, Pearle et al. 2007). Es kommt zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Adipozytokine und anderer Entzündungsmediatoren in der Synovialflüssigkeit der erkrankten Patienten. In Bezug auf die RA und die OA ist der Ursprungsort dieser Mediatoren jedoch unterschiedlich. In der Pathogenese der RA bildet die entzündete Gelenkkapsel die eigentliche Quelle der Zytokine. Die OA ist zwar auch durch eine episodische Synovitis gekennzeichnet, doch die Entzündungsmediatoren werden in diesem Fall hauptsächlich von den aktivierten Chondrozyten selbst produziert (Benito et al. 2005).

Sowohl in RA- als auch in OA-Gewebe kann ein signifikanter Anstieg der IL1- und der TNF $\alpha$ -Freisetzung gemessen werden. Als Antwort auf diese proinflammatorischen Zytokine steigern die Chondrozyten die Produktion von Matrix-abbauenden Proteinase, Prostaglandin, Stickstoffmonoxid und weiteren Entzündungsmediatoren (Loeser 2006). Zusätzlich führt eine Hochregulation der NF- $\kappa$ B- sowie der MAPK-Signalwege zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Gene und Proteine (Berenbaum 2004). IL1, TNF $\alpha$  und Knorpelgewebe-abbauende Proteinase wie MMP1, MMP3,

MMP8 und MMP13 lassen sich sowohl in der erkrankten Matrix von OA- als auch von RA-Gelenken nachweisen (Fraser et al. 2003, Tetlow et al. 2001).

Die zellulären und biochemischen Mechanismen hinter den Krankheitsbildern der OA und der RA sind daher sehr verschieden. Doch in beiden Fällen bewirkt eine Entzündungsreaktion ein Ungleichgewicht im Knorpelstoffwechsel. Der Verlust der Stoffwechsellhomöostase veranlasst die vermehrte Freisetzung proteolytischer Enzyme und führt auf diese Weise zu einer Zerstörung des Gelenkknorpels.

## **1.4 Therapeutische Behandlungsansätze**

### **1.4.1 Bisherige Leitlinientherapie**

Sobald die Diagnose der rheumatoiden Arthritis gestellt ist, sollte laut den *Leitlinien zur Behandlung Rheumatoider Arthritis* eine Therapie mit klassischen DMARDs eingeleitet werden. Die DMARDs sind eine heterogene Gruppe an Immunmodulatoren mit unklarem Wirkungsmechanismus und ausgeprägten Nebenwirkungen. Da die Erkrankung zu einer progressiven Knorpel- und Knochenzerstörung führt, bedeutet eine Verzögerung des Behandlungsbeginns einen schlechteren Langzeitverlauf. Bei einem Großteil der Patienten führt die DMARD-Therapie zur Krankheitsremission oder zumindest zu einer Verminderung der Krankheitsprogression (Lard et al. 2001). Em-

pfohlene Kombinationspräparate sind Glukokortikoide, Biologika, Analgetika und Antiphlogistika. Zusätzlich führen auch Krankengymnastik, physikalische Therapien und Ergotherapie zu einer Verbesserung der Krankheits-symptomatik. Schwerste Gelenkveränderungen wie eine zunehmende Knorpelzerstörung, einhergehend mit Ruheschmerzen, können auch operativ versorgt werden. Das Einsetzen einer Endoprothese führt in diesem Fall zur Schmerzreduktion sowie zur verbesserten Beweglichkeit und Gelenkstabilität. Abgesehen von einer Operation als ultima ratio, hat die Einführung einer frühzeitigen Biologika-Therapie den Krankheitsverlauf der RA bereits sehr verbessert (Kyburz et al. 2011). Trotz des stetig zunehmenden Einsatzes dieser Biopharmazeutika ist deren Nebenwirkungsprofil bislang jedoch noch sehr groß (Codreanu und Damjanov 2015, van Vollenhoven 2009).

Ähnlich wie die RA ist auch die OA eine progressive Erkrankung. Der Krankheitsverlauf ist zu Beginn in der Regel asymptomatisch. Da Marker zur Früherkennung fehlen, führt dies dazu, dass die Erkrankung erst in bereits fortgeschrittenem Stadium durch Bewegungsschmerzen und einen Verlust an Mobilität erkannt wird. Laut der *Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft* sind die Therapieziele von diesem Zeitpunkt an die Schmerzlinderung, Entzündungsreduktion, Funktionsverbesserung und Verzögerung der Krankheitsprogression. Die Behandlungsmöglichkeiten bieten eine Kombination aus allgemeinen Maßnahmen wie Gewichtsreduktion bei Übergewicht, Physiotherapie sowie eine entzündungshemmende Schmerzmedika-

tion. Keine der genannten Therapiemaßnahmen ist jedoch in der Lage, das zerstörte Knorpelgewebe adäquat zu regenerieren, sodass auch im Fall der OA als letzte Option der endoprothetische Gelenkersatz der Goldstandard ist, um die Gelenkfunktion wieder herzustellen (Johnson und Hunter 2014). Durch die Avaskularität des hyalinen Knorpels ist dessen eigene Regenerationsfähigkeit sehr begrenzt. Sobald das Gewebe beschädigt ist, wird es abgebaut und durch minderwertigen Faserknorpel ersetzt. Das Ziel therapeutischer Interventionen ist es, eine Regeneration des hyalinen Knorpels zu ermöglichen bzw. die Bildung eines Gewebes zu induzieren, das dem hyalinen Knorpel in seinen mechanischen und biologischen Eigenschaften gleichwertig ist. In vivo ist es bislang nicht möglich, eine Stammzelllinie zur Produktion hyalinen Knorpelgewebes anzuregen (Cucchiari et al. 2014). Aus diesem Grund untersuchen wir eine Art chondrogener Reparatur-Zellen, die in fortgeschrittenem Krankheitsstadium bereits im Knorpelgewebe von Patienten mit OA bzw. RA vorhanden sind. Wir nennen diese Zellen chondrogene Progenitorzellen (Schminke und Miosge 2014). Auf deren Erscheinungsform und Funktion im Knorpelgewebe wird im Laufe dieser Arbeit weiter eingegangen werden. Trotz eines enormen Wissenszuwachses auf dem Gebiet zellulärer und biologischer Stoffwechselmechanismen ist die Bildung von funktionellem, hyalinen Knorpelgewebe momentan noch eine große Herausforderung für die Geweberegeneration (Kuo et al. 2006).

### 1.4.2 Chondrogene Progenitorzellen

Chondrogene Progenitorzellen (CPCs) stellen eine besondere Zellpopulation dar, die während der Untersuchung geschädigten Knorpelgewebes entdeckt worden ist und sich durch ihren Stammzellcharakter und ein hohes chondrogenes Potenzial auszeichnet. Die Zellen finden sich im Reparaturgewebe des menschlichen Gelenkknorpels in den späten Stadien der OA sowie im Knorpelgewebe der Patienten mit fortgeschrittener RA (Koelling et al. 2009, Schminke und Miosge 2014). In gesundem Knorpelgewebe sind diese Zellen nicht nachweisbar (Koelling und Miosge 2010). Es wird vermutet, dass die CPCs im Rahmen der Knorpelschädigung über die sich bildenden Lücken in der *Tidemark* und einsprossende Gefäße vom Knochenmark in das Knorpelgewebe einwandern (Koelling und Miosge 2009). Nach der Isolation einer Progenitor-Zellpopulation aus humanem OA-Gewebe gelang es, diese über Migrationsversuche, RT-PCR, Immunzytochemie und FACS-Analyse zu charakterisieren. Trotz eines heterogenen Musters an Oberflächenmarkern lassen sich auf allen Zellen die Stammzellmarker CD29, CD73, CD105 und STRO-1 nachweisen. Des Weiteren zeigen alle Zellen *in vitro* sowie *ex vivo* ein sehr hohes Migrationspotential, das sie von den Chondrozyten der superfiziellen Knorpelzone deutlich abgrenzt. Zusätzlich ist es über verschiedene Mediatoren möglich, die CPCs sowohl zu Chondrozyten und Osteoblasten als auch zu Adipozyten zu differenzieren. Der Differenzierungsprozess zwischen chondrogener und osteoblastärer Zelllinie wird insbesondere

durch das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 bestimmt. Wird RUNX2 herunterreguliert, führt dies zu einem starken Anstieg des chondrogenen Potenzials. Es kommt zur Überexpression von SOX9, einhergehend mit einer vermehrten Produktion von Kollagen II und Aggrecan. Im Umkehrschluss führt das Herunterregulieren von SOX9 zu einem Ansteigen von RUNX2 mit gleichzeitiger Aktivierung osteoblastärer Stoffwechselprozesse. Während der Untersuchung der CPCs aus dem geschädigten Gelenkknorpel der Patienten mit RA fiel auf, dass diese Zellen stark durch Interleukine beeinflusst werden. Die Interleukine stammen vor allem aus dem entzündeten Gewebe des erkrankten Gelenks. Durch die Entstehung des inflammatorischen Umgebungsmilieus setzten die CPCs daraufhin vermehrt Matrix-Metalloproteinasen und proinflammatorische Zytokine frei. Dem Verlust des chondrogenen Potenzials kann durch die Gabe antiinflammatorischer Agenzien entgegengewirkt werden. Dies verdeutlicht die Bedeutsamkeit der Wirkung inflammatorischer Mediatoren auf die CPCs (Schminke und Miosge 2014). Somit werden nicht nur neue Einblicke in die Biologie von Progenitorzellen gewonnen, sondern ebenfalls die Grundbausteine für eine potenzielle regenerative Zell-basierte Therapie der OA und der RA gelegt. Denn objektiv betrachtet ist es sehr viel effizienter und sicherer, bereits im Gewebe vorhandene Zellen zur Regeneration anzuregen, als exogene Zellpopulationen in das geschädigte Gewebe einzusetzen.

## **1.5 Das Fettgewebe**

### **1.5.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ**

Die Adipozyten des Fettgewebes galten lange Zeit als rein fettreichernde Zellen. Innerhalb der letzten Jahre wurde diese Ansicht jedoch revolutioniert, sodass dem Fettgewebe inzwischen zusätzlich die Funktion eines endokrinen Organs zugeschrieben wird (Mohamed-Ali et al. 1998). Über die Freisetzung sogenannter Adipozytokine, wie zum Beispiel Adiponektin, Leptin, Resistin, sowie IL6 und TNF $\alpha$  greifen die Adipozyten in den menschlichen Stoffwechsel ein. Auf diese Weise beeinflussen sie zum Beispiel das Appetitempfinden, die Glukose-Homeostase und die Insulin-Sensitivität. Des Weiteren wird den Adipozytokinen ebenfalls eine entzündungs- und immunmodulierende Wirkung zugesprochen (Conde et al. 2011, Fiaschi et al. 2014). In diesem Rahmen scheinen auch Gelenkerkrankungen wie die Osteoarthrose und die Rheumatoide Arthritis durch die Fettgewebsmediatoren beeinflusst zu werden.

Die Adipozytokine werden hauptsächlich aus den Fettgewebszellen freigesetzt. Sie können jedoch auch von den Gelenkzellen selbst, insbesondere von den Chondrozyten produziert werden, sofern diese durch mechanische oder inflammatorische Stimuli dazu angeregt werden. Die Interaktion der Chondrozyten mit den Adipozytokinen, sowohl isoliert als auch in Kombination mit anderen inflammatorischen Zytokinen, führt zur Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren und Knorpel-zerstörender Enzyme. Es kommt

zu einem Teufelskreis, einhergehend mit einer stetig fortschreitenden Knorpeldegradation (Houard et al. 2013).

### **1.5.2 Adiponektin als potentiell anti-inflammatorisches Adipozytokin**

Adiponektin ist ein Adipozytokin, das hauptsächlich von ausdifferenzierten Fettgewebszellen sezerniert wird. Im Gewebe adipöser Patienten kommt es zu einer verminderten Adiponektinausschüttung, während eine Gewichtsreduktion zu einer gesteigerten Adiponektinfreisetzung führt. Im menschlichen Blut liegt es mit einer Konzentration von 5-10 µg/ml vor und stellt 0,01 % aller Serumproteine dar (Challa et al. 2010). Adiponektin kann in verschiedenen Isoformen auftreten. Die häufigsten Isoformen im menschlichen Serum sind die low-molecular-weight- (LMW) und die high-molecular-weight- (HMW) Varianten. Bislang konnten drei Adiponektinrezeptoren, T-Cadherin, AdipoR1 und AdipoR2, identifiziert werden. T-Cadherin ist bislang vor allem innerhalb von Endothelien beschrieben worden (Parker-Duffen et al. 2013). AdipoR1 wird hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert, während AdipoR2 größtenteils in der Leber zu finden ist. Trotz allem sind beide Rezeptoren in vielen weiteren Zelltypen und Geweben wie in den Synovialzellen, im Gelenkknorpel und im Knochen koexprimiert. Die Wirkung des Adiponektins wird hauptsächlich über die MAPK- und NF-κB-Signalwege vermittelt (Buechler et al. 2010, Koskinen et al. 2011). Entzündungsmediatoren wie IL6 und TNFα oder auch Glukokortikoide wirken hemmend auf das Adi-

ponektin, was darauf schließen ließe, dass dieses primär eine anti-inflammatorische Wirkung hat (Neumann et al. 2011). Die Funktionsweise des Adiponektins und die Tatsache, ob dieses nun tatsächlich anti-inflammatorisch oder pro-inflammatorisch wirkt, wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert (Gomez et al. 2009, Korkmaz 2012).

### **1.5.3 Leptin als pro-inflammatorisches Adipozytokin**

Leptin ist ein 16 kDa großes Protein, das 1994 als eines der ersten Adipozytokine entdeckt wurde und somit einen völlig neuen Blickwinkel auf die Funktionen des weißen Fettgewebes eröffnete. Leptin wird durch das *obese*-Gen kodiert und hauptsächlich von den Zellen des Fettgewebes freigesetzt (Zhang et al. 1994). Die zirkulierenden Leptinlevel korrelieren direkt mit dem Anteil des weißen Körperfettgewebes. Bei auftretender Adipositas sind diese somit erhöht. Sie werden durch die Nahrungsaufnahme, die Freisetzung von Sexualhormonen und Entzündungsmediatoren beeinflusst. Die Leptin-zugehörigen Rezeptoren sind die Ob (*obese*)-Rezeptoren, die ubiquitär im Gewebe vorkommen. Durch Bindung an diese Rezeptoren werden vor allem JAK- und MAPK-Signalwege aktiviert. In den Kernen des Hypothalamus hemmt Leptin das Auftreten von Hungergefühlen. Außerdem reguliert es den Fettstoffwechsel (Friedman und Halaas 1998). Des Weiteren hat Leptin auch immunmodulatorische sowie proinflammatorische Eigen-

schaften und spielt sowohl im Rahmen der RA als auch in Bezug auf die OA eine bedeutende Rolle (Gomez et al. 2009).

## **1.6 Entwicklung des Dissertationsthemas**

Die Idee für dieses Projekt entstand im Rahmen der wissenschaftlichen Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit Prof. Dr. Mary B. Goldring vom *Weill Cornell Medical College* in New York, USA, sowie durch den Informationsaustausch mit Prof. Dr. Efrat Monsonego-Ornan und Prof. Dr. Arie Gertler vom *Institute of Biochemistry and Nutrition* der Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel. Prof. Dr. Mary B. Goldring beschäftigte sich in einer Arbeitsgruppe mit den im Zusammenhang der OA auftretenden Entzündungsprozessen und beschrieb Zytokine, Chemokine, Alarmine sowie Adipozytokine als Ursache für die Krankheitsprogression (Houard et al. 2013). Auch Prof. Dr. Efrat Monsonego-Ornan und Prof. Dr. Arie Gertler untersuchten in verschiedenen Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen Adipozytokinen und dem Verhalten von Chondrozyten im Knorpelgewebe. Durch einen In-vitro-Stimulationsversuch konnte gezeigt werden, dass Adiponektin in der Lage ist, sowohl die Chondrozyten-Proliferation als auch deren Differenzierung direkt zu stimulieren (Challa et al. 2010). In einem weiteren Projekt wurde anhand eines In-vivo-Mausmodells die Leptinwirkung untersucht. Durch die Gabe eines hochpotenten reversiblen Leptinantagonisten kam es zur Blo-

ckade der pro-inflammatorischen Leptinwirkung mit einer Reduktion zirkulierender entzündungsfördernder Zytokine. Dies wirkte sich sowohl positiv auf das Körpergewicht als auch auf die Knochenstruktur aus (Solomon et al. 2014).

## **1.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit**

Die Adipozytokine stellen ein bedeutendes Bindeglied zwischen Adipositas, entzündlichen Stoffwechselerkrankungen und Gelenkschädigungen bei OA und RA dar.

In dieser Arbeit soll der Adiponektin- und Leptineinfluss auf CPCs untersucht werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf der Interaktion der CPCs mit zirkulierenden Entzündungsmediatoren. Bedingt durch dieses Wissen ermöglichen die Stimulationsversuche neue Einblicke in die Progenitor-Zellbiologie. Das Ziel ist es, in Zukunft möglicherweise die Produktion systemischer und lokaler Adipozytokine kontrollieren bzw. modulieren zu können. In Anbetracht dieser neuen Erkenntnisse wäre man in der Lage, die für die Knorpelschädigung verantwortlichen Entzündungsreaktionen zu reduzieren. Gleichzeitig würde man einen Angriffspunkt im Wirkmechanismus der Progenitorzellen schaffen, welcher den Grundbaustein einer potentiellen regenerativen Therapie darstellen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Medium

DMEM Medium Gibco by life technologies Corporation

DMEM (1x) + GlutaMax

Paisley, United Kingdom

Nährmedium DMEM Medium + 20% FCS + Penicilin/Streptomycin

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

SDS - Probenpuffer 3-fach 3,6 g Tris 0,3 M MG 121,14

9 g SDS 9 %

22,5 g Glycerin 22,5 %

SDS - Probenpuffer 5-fach 6,05 g Tris 0,5 M MG 121,14

15 g SDS 15 %

37,5 g Glycerin 37,5 %

Laufpuffer 5-fach 30,3 g Tris 0,25 M

142,6 g Glycin 1,9 M

50 ml SDS 10 %

mit H<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen

Transferpuffer

6,05 g Tris 25 mM

28,8 g Glycin 192 mM

400 ml Methanol 20 %

mit H<sub>2</sub>O auf 2 l auffüllen

pH 8,3

Sammelgelpuffer

15,1 g Tris 0,5 M

250 ml H<sub>2</sub>O

mit HCl auf pH 6,8

Trenngelpuffer

45,4 g 1,5 M Tris

250 ml H<sub>2</sub>O

mit HCl auf pH 8,9

PBS 10%

81,8 g NaCl

2,0 g KCL

16,0 g  $\text{NA}_2\text{HPO}_4$

2,0 g  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$

mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1l auffüllen

pH 7,4

TBS-T 10-fach

24,2 g Tris 200 mM

87,6 g NaCl 1,5 M

mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1l auffüllen

pH 7,4

Blocklösung

Milchpulver 5 % in TBS-T

Färbelösung

0,1 g Brilliant-Blau R250 0,1 %

50 ml Methanol 50 %

7 ml Essigsäure 7 %

mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml auffüllen

Entfärbelösung I

50 mL Methanol 50 %

7 mL Essigsäure 7 %

mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml auffüllen

### 2.1.3 Chemikalien

---

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe, DE
Aluminiumsulfat	AppliChem	Darmstadt, DE
Ameisensäure	Roth	Karlsruhe, DE
Ammonium-Peroxidsulfat	Roth	Karlsruhe, DE
Brilliant Blau R250	Roth	Karlsruhe, DE
Bromphenol Blau	Roth	Karlsruhe, DE
DEPEC	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
EDTA	Roth	Karlsruhe, DE
Essigsäure	AppliChem	Darmstadt, DE
Ethanol absolut	AppliChem	Darmstadt, DE
Glycerin	Roth	Karlsruhe, DE
Glycin	AppliChem	Darmstadt, DE
HCl	Merck	Darmstadt, DE
Isopropylalkohol	Roth	Karlsruhe, DE
KCl	Merck	Darmstadt, DE
$\text{KH}_2\text{HPO}_4$	Merck	Darmstadt, DE
Methanol	Roth	Karlsruhe, DE
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, DE
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	AppliChem	Darmstadt, DE
NaCl	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE

PBS	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
SDS	Roth	Karlsruhe, DE
TEMED	Roth	Karlsruhe, DE
Tris	Roth	Karlsruhe, DE
Tween	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE

---

#### 2.1.4 Reagenziensätze und Kits

---

Quanti Tect Reverse Transcription Kit	Quiagen	Venlo, NL
peqGOLD Total RNA Kit	peqlab	Erlangen, DE
SYBR-Green	peqlab	Erlangen, DE
PageRuler	Thermo Fisher	Waltham, USA

---

#### 2.1.5 Membranen und Fotochemikalien

---

Entwicklerlösung	Kodak	Rochester, USA
Fixierlösung	Kodak	Rochester, USA
PVDF-Membran	Millipore	Darmstadt, DE

---

## 2.1.6 Antikörper

### Primär-Antikörper

#### Mouse Anti-human Adiponectin

PreproTech: ab437p

Herkunft: Maus, IgG, monoklonal

Verdünnung: 1:250, 1h

#### Ob (F-3) Leptin AK

Santa Cruz: sc-48408

Herkunft: Maus, IgG, monoklonal

Verdünnung: 1:200, 1h

#### AdipoR1 (H-40) Adiponektin-Rezeptor AK

Santa Cruz: sc-99183

Herkunft: Kaninchen, IgG, polyklonal

Verdünnung: 1:100, 1h

#### Ob-R (H-300) Leptin-Rezeptor AK

Santa Cruz: sc-8325

Herkunft: Kaninchen, IgG, polyklonal

Verdünnung: 1:100, 1h

Sekundär-Antikörper Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 555

Abcam: ab150074

Herkunft: Esel, gerichtet gegen Kaninchen,  
IgG, polyklonal

Verdünnung: 1:1000, 30-60 min

Goat Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 555

Abcam: ab150114

Herkunft: Ziege, gerichtet gegen Maus,  
IgG, polyklonal

Verdünnung: 1:1000, 30-60 min

### **2.1.7 Stimmulationsproteine**

Active human Adiponectin full length protein

Abcam: ab157078

Herkunft: HEK 293 Zellen, human, rekombinant

Verdünnung: 500 ng/ml

Human Leptin full length protein

Abcam: ab13987

Herkunft: Aminosäuresequenz, human, rekombinant

Verdünnung: 100 ng/ml

## 2.1.8 Primerliste

Tabelle 1: Primer, die zur Durchführung der PCR verwendet wurden

Zielgen	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperature
IL1	ATCAGTACCTCACGGCTGCT	CTTCATCTTGGGCAGTCACA	60 °C
TNF $\alpha$	TCCTTCAGACACCCTCAAC	GTAGGCCCCAGTGAGTTCTG	63 °C
IL6	CAGCCCTGAGAAAAGGAGACAT	AATCTGAGGTGCCCATGCTAC	63 °C
IL10	AGGATCAGCTGGACAACCTTGT	GGAGTTCACATGCGCCTTG	58 °C

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivieren von CPCs

Die chondrogenen Progenitorzellen (CPCs) wurden bereits zuvor aus operativ gewonnenem Gewebe isoliert, durch Transfektion mit hTERT immortalisiert.

siert und in einem Einfriermedium aus 10 % DMSO, 20 % FBS und 70 % Nährmedium (DMEM) in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das entnommene Patientengewebe wurde anonym entsprechend den Vorgaben des Ethikantrages lediglich hinsichtlich Alter, Gewicht und Geschlecht katalogisiert. Der Ethikantrag ist unter der Nummer 25/12/10 einzusehen.

Die aufgetauten CPCs wurden auf mehrere, mit je 10 ml Nährmedium versetzte Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) verteilt, um eine ausreichende Zellanzahl für die folgenden Versuche heranzuzüchten. Alle drei Tage wurden die Zellen in den Kulturflaschen mit frischem Nährmedium (DMEM) versetzt, welches der Erhaltung des Stoffwechsels und der Vermehrung der Zellen diente.

Bevor das Medium gewechselt wurde, beurteilte man zunächst unter dem Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, DE) die Ausbreitung der Zellen am Boden der Zellkulturflaschen. Bei einer Konfluenz von über 90 % war es möglich, dass die CPCs sich in ihren Eigenschaften verändert hatten. Um die Untersuchungsergebnisse nicht zu verfälschen, sollte demzufolge eine zu hohe Konfluenz der Zellen in den Kulturflaschen vermieden werden.

#### **2.2.1.2 Passagieren von CPCs**

Bei einer Konfluenz der CPCs von 80-90 % wurden die Zellen geerntet. Dies erfolgte mit Hilfe des Enzyms Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach). Zunächst musste das Medium aus den Kulturflaschen entfernt werden. Um eventuelle Rückstände des Mediums zu vermeiden, die die Wirkung des Trypsins ge-

hemmt hätten, wurden daraufhin die Kulturflaschen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Nun konnten 2 ml Trypsin in jede Kulturflaschen pipettiert werden. Durch die Verteilung des Enzyms auf dem Boden der Kulturflaschen konnten die adhärenen Zellen von der Oberfläche gelöst werden. Zur Unterstützung der Wirkungsweise des Trypsins wurden die Kulturflaschen bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Nach zwei bis drei Minuten konnte der Ablösevorgang der Zellen vom Boden der Kulturflaschen unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Leichtes Klopfen mit der Hand an die Seitenflächen der Kulturflaschen ermöglichte die Mobilisierung noch haftender Zellen. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden das gleiche Volumen an Medium, wie zuvor Trypsin, auf die Zellen gegeben. Das Gemisch aus abgelösten Zellen, Trypsin und Medium konnte daraufhin in ein 50 ml *Falcon-Tube*-Röhrchen überführt werden. Weitere Zellrückstände wurden durch Spülung der Kulturflaschen mit weiteren 2-4 ml Medium mobilisiert und ebenfalls in das *Falcon-Tube*-Röhrchen gegeben. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation dieses Röhrchens bei 1200 rpm. Nach der Abnahme des Überstandes konnte das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert werden. Die Nutzung eines Zellometers (Cellometer Auto T Cell Counter, Nexelcom Bioscience, Lawrence, USA) ermöglichte eine relativ schnelle Bestimmung der Zellzahl pro ml. Anschließend konnten die mit 10 ml frischem Medium befüllten Zellkulturflaschen erneut mit  $7 \times 10^4$  Zellen beimpft werden. Die restlichen in PBS resuspendierten Zellen wurden erneut

10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet bei – 81 °C eingefroren.

### **2.2.1.3 Zellgewinnung**

Die Zellgewinnung glich dem zuvor beschriebenen Passagiervorgang der Zellen. Im Unterschied zum Passagieren der CPCs wurden die Kulturflaschen jedoch nicht erneut beimpft. Das aus dem ersten Zentrifugationsschritt gewonnene Zellpellet musste aber ebenfalls in PBS gelöst werden, um die Zellzahl pro ml im Zellometer bestimmen zu können. Daraufhin wurden die gelösten Zellen nochmals zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Ablauf dieser Arbeitsschritte konnte das Zellpellet nach Dokumentation von Zellreihe, Zellzahl, Passage und Datum bei – 81 °C verwahrt werden.

### **2.2.1.4 Zellstimulation**

Bevor die Zellen stimuliert werden konnten, wurden diese zunächst bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70 % angezchtet. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel, um in allen Zellkulturflaschen die gleiche Ausgangssituation für die Stimulationsversuche zu schaffen. Sowohl die OA- als auch die RA-CPCs wurden anschließend mit Adiponektin und Leptin stimuliert. Dabei erfolgten die Stimulationsversuche jeweils drei Mal, um das Risiko eventueller Fehlerquellen zu minimieren. Parallel zu den stimulierten Zellen wurde

jeweils eine Kulturflasche als spätere Kontrollgruppe unbehandelt gelassen. Pro Versuchsdurchführung ergaben sich somit acht Kulturflaschen. In vier dieser Flaschen waren OA-CPCs angezüchtet worden und in den anderen vier Flaschen wuchsen RA-CPCs. Beide Zellreihen wurden mit 500 ng/ml Adiponektin, bzw. mit 100 µg/ml Leptin stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 48 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium verworfen. Die CPCs konnten als Zellpellet gemäß der unter 2.2.1.3 bereits beschriebenen Verfahrensweise nach Dokumentation von Zellzahl und Stimulationsparametern bei – 81 °C konserviert werden.

## **2.2.2 Immunfluoreszenz**

In der Immunfluoreszenz werden Antigene zu untersuchender Strukturen durch Antikörper, die an fluoreszierende Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome, gebunden sind, sichtbar gemacht. Die Fluorochrome werden mit Licht bestimmter Wellenlängen bestrahlt, um anschließend das von diesen daraufhin emittierte Licht messen zu können.

### **2.2.2.1 Mikroskopische Darstellung der Immunfluoreszenz**

Die Untersuchungsmethode der Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Adipozytokine Adiponektin und Leptin sowie deren Rezeptoren in den CPCs nachzuweisen. Alle Versuchsreihen sind exemplarisch jeweils drei Mal durchgeführt worden.

Im Rahmen der Immunfluoreszenz wurden CPCs aus osteoarthrotischem und rheumatoid arthritischem Knorpelgewebe verwendet. Für die Nachweisreaktionen war es notwendig, die Zellen, statt in Kulturflaschen, auf sterilen Deckgläschen (DG, Durchmesser: 12 mm) in einer 24-Well-Platte heranzuzüchten. Die Deckgläschen wurden zuvor mit einer ebenfalls sterilen Pinzette in die einzelnen Wells gelegt. Pro Well erfolgte daraufhin die Resuspension von  $1 \times 10^4$  Zellen in 1 ml DMEM, um diese anschließend gleichmäßig auf den Deckgläschen verteilen zu können. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank waren die CPCs konfluent auf den Deckgläschen angewachsen.

Das Nährmedium konnte abgesaugt werden, und die Deckgläschen wurden zwei Mal mit je 100 µl PBS pro Well gewaschen. Das Absaugen von Nährmedium und PBS erfolgte mittels einer Wasserstrahlpumpe. Zur Vorbereitung der weiteren Reaktionsschritte erfolgte die Platzierung der Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette auf einem mit Parafilm überspannten Plastikblock. Die Immunreaktion konnte anschließend nach folgendem Protokoll durchgeführt werden:

Fixierung	15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 %-igem Paraformaldehyd in PBS, 100 µl pro DG
Waschen	zweimal mit PBS, 100 µl pro DG

Permeabilisierung	10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,25 %-igem Triton-X100 in PBS, 100 µl pro DG
Waschen	mit PBS, bis das Triton komplett entfernt ist, 100 µl pro DG
Blocken	15 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 %-igem BSA in PBS, 100 µl pro DG
Primär-AK	den Primär-Antikörper mit 1 %-igem BSA in PBS verdünnen 25-50 µl pro DG, anschließend die Zellen 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren lassen
Waschen	zweimal mit PBS, 100 µl pro DG
Sekundär-AK	den Sekundär-Antikörper mit 1 %-igem BSA in PBS + DAPI verdünnen, 1:1000 25-50 µl pro DG, anschließend die Zellen erneut 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren lassen
Waschen	zweimal mit PBS, 100 µl pro DG
Eindeckeln	ungefähr 10 µl <i>Fluorescens Mounting Medium</i> (DAKO) vorsichtig auf einen Objektträger geben und das DG umgekehrt (mit den Zellen nach unten) leicht auf das Eindeckmedium drücken, überschüssiges Medium eventuell absaugen

Nach Abschluss der Immunreaktion konnten die durch den Sekundär-Antikörper und das DAPI fluoreszierenden Zellen auf dem Objektträger fotografiert werden (MOLCI, *Molecular and Optical Live Cell Imaging*). Bei kühler Lagerung blieb die Fluoreszenz der Zellen ungefähr eine Woche lang bestehen.

### 2.2.3 RNA-Isolation aus primären Zellen

Zur Durchführung der RNA-Isolation aus primären Zellen ( $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$ ) wurden diese zunächst trypsiniert und abzentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Durchführung nach folgendem Protokoll:

1. das gewonnene Zellpellet in 400  $\mu$ l RNA Lysis-Buffer T resuspendieren
2. eine Säule zur DNA-Entfernung (*DNA Removing Column*) in ein Sammelröhrchen stecken und die Zellsuspension auf die Säule pipettieren
3. eine Minute bei 12.000 x g (rcf) zentrifugieren
4. den Durchfluss und das identische Volumen an 70 %-igem Ethanol vorsichtig auf- und abpipettieren
5. eine Säule zur RNA-Bindung (*Perfect Bind RNA*) in ein neues Sammelröhrchen stecken und das Ethanol-Durchfluss-Gemisch darauf geben

6. eine Minute bei 10.000 x g (rcf) zentrifugieren
7. den Durchfluss verwerfen
8. 500 µl *RNA Wash Buffer I* auf die Säule geben und 15 Sekunden bei 10.000 x g (rcf) zentrifugieren
9. den Durchfluss verwerfen
10. 600 µl des *RNA Wash Buffer II* auf die Säule geben und erneut 15 Sekunden bei 10.000 x g (rcf) zentrifugieren
11. diesen Schritt einmal wiederholen
12. das Sammelröhrchen leeren und die Säule im selben Röhrchen zwei Minuten bei 10.000 x g (rcf) vollständig trocknen
13. daraufhin die Säule in ein 1,5 ml E-Cup (*Biopur*) stecken, den Deckel und die Seite beschriften und 30 bis 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren, diese dabei jedoch nicht berühren
14. eine Minute bei 5.000 x g (rcf) zentrifugieren, der Durchfluss enthält nun die RNA
15. 2 µl des Durchflusses im Photometer messen, um den RNA-Gehalt zu bestimmen

Die gewonnene RNA konnte nun entweder bei – 80 °C aufbewahrt oder direkt in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA bildete anschließend das Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion.

#### 2.2.4 Synthese von cDNA

Um mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression der Zellen darzustellen, musste die gewonnene mRNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Für diesen Vorgang wurde ein Kit der Firma *Peqlab* genutzt, welches folgende Substanzen enthielt: einen DNAsen enthaltenden *DNA wipeout Buffer*, ein Röhrchen mit Reverser Transkriptase, einen *Reverse Transkriptase Buffer* sowie einen vorgefertigten Primermix. Es war wichtig, während der Pipettiervorgänge stets auf Eis zu arbeiten, um das Zerfallen der mRNA zu vermeiden. Als Erstes wurde die mRNA zwei Minuten bei 42 °C im *DNA wipeout Buffer* inkubiert, um eventuell vorhandene restliche DNA zu eliminieren. In einem zweiten Schritt konnten dann die Reverse Transkriptase, der *Transkriptase Buffer* und der Primermix hinzugegeben und für 15 Minuten erneut bei 42 °C inkubiert werden. In diesem Schritt erfolgte die eigentliche Umschreibung der mRNA zu cDNA. Anschließend musste die Probe für drei Minuten auf 95 °C erhitzt werden. Dies führte dazu, dass sich die gebildeten Stränge wieder voneinander lösten und die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. In einem letzten Schritt erfolgte die Verdünnung der cDNA enthaltenden Probe mit RNase-freiem Wasser. Davon ausgehend, dass das Umschreiben der mRNA in cDNA in einem Verhältnis von 1:1 stattgefunden hatte, wurde der cDNA-Menge entsprechend soviel Wasser hinzugegeben, dass die Endkonzentration bei 1 ng/μmol lag. Die Probe konnte nun bei - 20 °C gelagert werden.

### 2.2.5 Allgemeines zur PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) ist ein künstliches Verfahren, um spezielle DNA-Abschnitte zu amplifizieren und quantifizierbar zu machen. In einem sogenannten Thermocycler wird die Ausgangs-DNA mit spezifischen Primern, freien Nukleotiden und DNA-Polymerasen zusammengebracht. Der Thermocycler durchläuft dann automatisch 30-50 Zyklen. Pro Zyklus steigt die Zahl der DNA-Doppelstränge exponentiell an, sodass nach einer bis zwei Stunden ausreichend Erbgut vervielfältigt worden ist. Ein Zyklus besteht aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation. Während der Denaturierung wird die DNA auf 90 °C erhitzt. Dieser Prozess führt dazu, dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen lösen und die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt werden kann. Darauf erfolgt die Hybridisierung. Die Temperatur wird gesenkt und auf einem Wert gehalten, der die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA ermöglicht. Der letzte Schritt, die Elongation, erfolgt bei 72 °C und beschreibt die eigentliche Vervielfältigung der DNA. Die Taq-Polymerase wandert, von den Primern ausgehend, vom 3' zum 5'-Ende die Einzelstränge entlang und füllt die Lücken mit freien komplementären Nukleotiden auf. Das Produkt der PCR kann dann über eine Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner spezifischen Größe identifiziert werden.

### 2.2.5.1 Quantitative RT-PCR

Die Grundlage der quantitativen Real-Time-PCR ist die herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion. Dieses Verfahren ermöglicht jedoch zusätzlich die sofortige Quantifizierung der vervielfältigten Nukleinsäuresequenzen. Das Prinzip beruht auf dem Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in das gebildete PCR-Produkt. Der SYBR-Green-Farbstoff interkaliert mit der DNA und fluoresziert bei der Bindung an Doppelstränge sehr viel stärker als bei der Bindung an Einzelstränge. Während die DNA pro Reaktionszyklus verdoppelt wird, steigt somit auch die Fluoreszenz exponentiell an. Die Amplifizierung wird gemessen, indem der Thermocycler den Zyklus misst, in welchem ein zuvor vom Programm festgelegter Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wird. Diese Zyklusanzahl gibt dann den entsprechenden *ct*-Wert (*threshold cycle*) an. Da die Menge an SYBR-Green proportional zur Menge der eingesetzten DNA-Moleküle ist, lässt deren Messung Rückschlüsse auf die Genexpression zu. Ist der *ct*-Wert sehr niedrig, zeigt dies, dass die Fluoreszenz den Schwellenwert sehr früh übersteigt. Daraus folgt, dass die mRNA-Menge relativ hoch gewesen sein muss. Im Umkehrschluss weist ein hoher *ct*-Wert auf eine niedrige Ausgangs-mRNA-Menge hin. Der Anstieg des *ct*-Wertes ist in der längeren Detektionszeit der Fluoreszenz begründet.

### 2.2.5.2 Protokoll der RT-PCR

Zur Durchführung der Real-Time-PCR erfolgte die Nutzung des *KAPA SYBR FAST Universal Kits von Peqlab*. Der entsprechende Primer-Mix aus forward- und reverse-Primer (je 100 pmol/  $\mu\text{l}$ ) wurde mit 10 pmol/  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Zunächst musste für jede zu untersuchende DNA-Sequenz ein Mastermix aus dem oben genannten Primer-Mix, SYBR-Green und RNase-freiem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup pipettiert werden. Um eventuelle Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, war es notwendig, jeweils mit einem zusätzlichen Ansatz zu arbeiten. Der nachfolgenden Tabelle entsprechend ergaben sich pro Ansatz 8  $\mu\text{l}$ , die dann auf eine PCR-Platte mit 96 Wells aufzutragen waren. Danach wurden zusätzlich jeweils 2  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden cDNA in die Wells pipettiert, sodass sich insgesamt 10  $\mu\text{l}$  (8  $\mu\text{l}$  Master-Mix + 2  $\mu\text{l}$  cDNA) in jedem Well befanden.

**Tabelle 2: Pipettierschema des PCR-Master-Mix-Ansatzes**

Mastermix pro Well	Menge in $\mu\text{l}$
SYBR-Green	5 $\mu\text{l}$
Primer-Mix (forward, reverse)	2 $\mu\text{l}$ (je 20 pmol)
RNase freies H <sub>2</sub> O	1 $\mu\text{l}$
Totalvolumen	8 $\mu\text{l}$

Zu Versuchsbeginn war die 96-Well-Platte mit einem Dichtfilm (*Microseal B Adhesive*, Biozym) beklebt worden. Demzufolge mussten die zu benutzen-

den Wells zunächst mit einem Skalpell freigeschnitten werden, während die übrigen verschlossen blieben. Nachdem der Mastermix samt entsprechender cDNA verteilt worden war, wurden die entsprechenden Wells mit *Flat Cap Strips* (Biozym) verschlossen. Um sicherzustellen, dass sich die Ansätze am Boden der einzelnen Wells befanden, erfolgte eine kurze Zentrifugierung der gesamte Platte. Anschließend konnte die Well-Platte im *Mastercycler* (Eppendorf) platziert, die *Realplex-Software* am dazugehörigen Com-

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Aktivierung	95 °C	5 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	45 x
Annealing	Primer-spezifisch	15 Sekunden	

die RT-PCR nach folgendem Protokoll gestartet werden.

**Tabelle 3: RT-PCR-Protokoll**

Elongation	72 °C	20 Sekunden
Finale Extension	72 °C	10 Minuten
Schmelzkurve	Ann. Temp. -1 °C bis 95 °C in 0.2 °C Schritte	15 Sekunden je 8 Sekunden

### 2.2.6 Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen - Pfaffl

Die statistische Auswertung und relative Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse erfolgte anhand der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, die 2001 von Michael Walter Pfaffl beschrieben wurde. Dieses Verfahren ist ein mathematisches Modell zur Datenanalyse, das durch die Berechnung eines relativen Expressionsverhältnisses eine zuverlässige statistische Auswertung der Expressionsergebnisse ermöglicht. Im Rahmen dieser Methode wird zunächst die Expression der zu untersuchenden Zielgene anhand der Expression eines nicht regulierten und ubiquitär homogen exprimierten HKGs (Housekeeping-Genes) normalisiert. Die Ergebnisse der Normalisierung entsprechen den  $\Delta CT$ -Werten. Als HKG wurde in diesem Fall  $\beta$ -2-Microglobulin gewählt, da dessen Expression während der PCR-Untersuchungen in allen verwendeten

DNA-Proben konstant blieb. Die relative Expression des Gens in den zu untersuchenden Proben wurde daraufhin in einem weiteren Schritt auf ein Kontrollprobenmaterial (nicht stimulierte CPCs aus osteoarthritischem sowie aus rheumatoid-arthritischem Knorpel) bezogen. Aus diesem Vergleich der relativen Expression des Zielgens und der relativen Expression des Kontroll-, bzw. Referenzgens resultieren die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. In einem dritten Schritt ließen sich anschließend mittels der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  die gesuchten Expressionsunterschiede bestimmen. Das Signifikanzniveau der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte lag bei  $p < 0,05$ . Die PCR-Untersuchungen wurden jeweils dreimal durchgeführt, um die Reliabilität der Ergebnisse garantieren zu können.

### **2.2.7 Primerdesign**

Einige der in der RT-PCR genutzten Primer wurden zuvor über die Software *primer3* ([www.primer3.ut.ee](http://www.primer3.ut.ee)) designed. Beim Primerdesign war darauf zu achten, dass die Länge der Primer zwischen 18 und 22 Basenpaaren lag, deren GC-Gehalt größer als 40 %, jedoch kleiner als 60 % war, forward- und reverse-Primer in ihrer Annealing Temperatur nicht mehr als 1,0 °C voneinander abwichen und das gebildete Produkt nicht mehr als 200 Basenpaare betrug. Die designte Sequenz konnte anschließend anhand der *NCBI Blast Datenbank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf Alignements überprüft werden. Bei 100 %iger Übereinstimmung mit dem zu untersuchenden Gen und weniger als 65 % unspezifischer Alignements wurde die designte

Sequenz zu der Firma *Operon Biotechnologie GmbH* nach Köln geschickt. Dort erfolgte die Synthese der gewünschten Primer. Nach dem Eintreffen der Primer in unserem Labor mussten diese, den Herstellerangaben entsprechend, zunächst in RNase-freiem Wasser resuspendiert werden, um daraufhin bei - 21 °C gelagert werden zu können.

### **2.2.7.1 Gradienten-PCR**

Die Methode der Gradienten-PCR wurde genutzt, um die spezifische Annealing-Temperatur des forward- und reverse-Primers zu ermitteln.

Die Annealing-Temperatur gibt die Zeitspanne an, während der sich die Primer an die komplementäre DNA-Zielsequenz anlagern. Dieses Verhalten ist für die Effizienz der RT-PCR von großer Bedeutung. Als Folge einer zu gering gewählten Temperatur kommt es zu unspezifischen Bindungen und unerwünschter Produktbildung, während zu hohe Temperaturen die Anlagerung der Primer verhindern.

Zur Durchführung der Gradienten-PCR wurde für jeden Primer und jede Temperatur ein identischer Ansatz in eine PCR-96-Well-Platte pipettiert. Das Pipettierschema entsprach dem der RT-PCR. Die Ermittlung der Annealing-Temperatur erfolgte dann in einem einzigen Untersuchungslauf, indem der *Thermocycler* (Mastercycler, Eppendorf) zwischen der linken und der rechten Blockseite eine Temperaturdifferenz generierte. Die durchlaufenen Temperaturen lagen bei 52 °C, 52,2 °C, 53,1 °C, 54,6 °C, 56,4 °C, 58,5 °C, 60,7 °C, 62,9 °C, 64,9 °C, 66,6 °C, 67,8 °C und 68,5 °C. Nach dem Durchlauf aller

Reaktionszyklen wurden die einzelnen Schmelzkurven miteinander verglichen, um die Temperatur mit der höchsten Extinktion (einem hohen schlan-ken Peak in der Schmelzkurve) zu bestimmen. Daraufhin konnte diese Tem-peratur dann als Annealing-Temperatur für den neuen Primer festgelegt werden. Zur Überprüfung der Primer-Spezifität wurden nun 20 µl des jewei-ligen PCR-Produkts, sowie 20 µl des entsprechenden forward-Primers zu *Seqlab Laboratories* (Göttingen) geschickt, um dieses dort sequenzieren zu lassen. Nach Erhalt der Sequenzierungsprodukte mussten diese erneut mit Hilfe des Blasting-Programms unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> überprüft werden. Somit wurde sichergestellt, dass die gebildeten PCR-Produkte auch den gesuchten Gensequenzen entsprachen. Sofern die ab-schließende Kontrolle der Primer zufriedenstellend war, konnten diese fort-an im Rahmen der PCR-Untersuchungen genutzt werden.

### **3 Ergebnisse**

Die immunzytochemischen Untersuchungen sowie die Resultate der Stimulationsversuche der CPCs mit Adiponektin und Leptin bilden die Ergebnisschwerpunkte der vorliegenden Arbeit.

Die immunzytochemischen Nachweisreaktionen von Adiponektin, Leptin und deren Rezeptoren wurden an CPCs aus osteoarthrotischem (OA) und rheumatoid arthritischem (RA) Knorpelgewebe durchgeführt.

Die durch die Adipozytokinstimulation induzierten Genexpressionsveränderungen der Entzündungsmediatoren IL1, IL6, IL10 und TNF $\alpha$  wurden daraufhin mittels Polymerase-Kettenreaktion dargestellt.

#### **3.1 Darstellung der immunzytochemischen Untersuchungen**

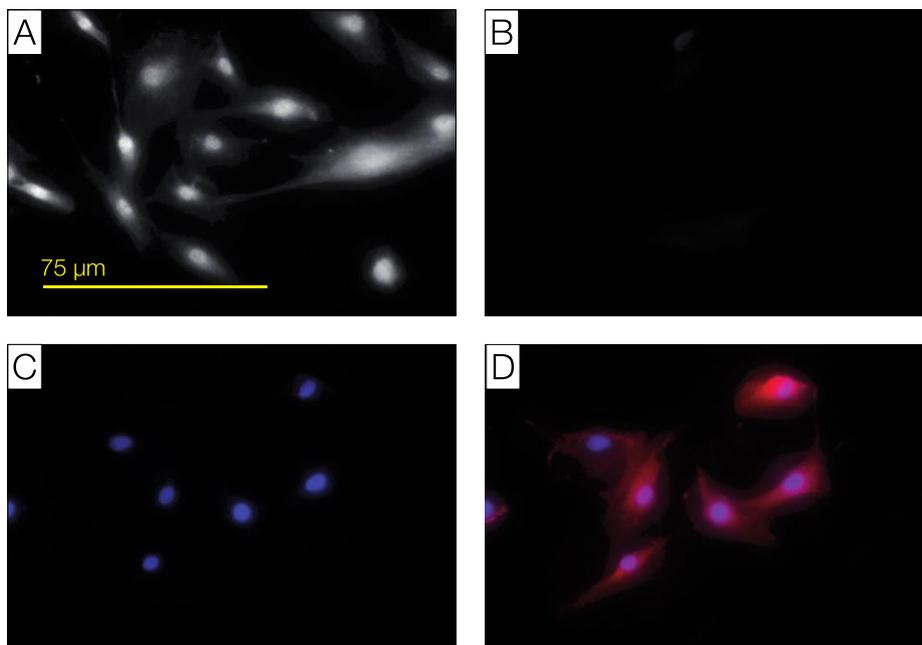
In den CPCs aus osteoarthrotischem Knorpelgewebe werden sowohl der Adiponektinrezeptor (Abb. 1), als auch der Leptinrezeptor exprimiert (Abb. 3). Adiponektin ist in den OA-CPCs ebenfalls nachweisbar (Abb. 5). Leptin ist jedoch nicht zu erkennen (Abb. 7).

Die CPCs aus dem Gelenkknorpel von Patienten, die an RA erkrankt sind, weisen den Adiponektinrezeptor (Abb. 2) sowie den Leptinrezeptor auf (Abb. 4).

In den RA-CPCs sind zusätzlich sowohl Adiponektin (Abb. 6) als auch Leptin nachweislich vorhanden (Abb. 8).

### 3.1.1 Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs

Abbildung 1 zeigt die Lokalisation des Adiponektinrezeptors innerhalb der CPCs aus osteoarthrotisch erkranktem Knorpelgewebe. Der Nachweis der Rezeptormoleküle erfolgte mittels eines roten Fluoreszenzfarbstoffes. Die Adiponektinrezeptoren sind hauptsächlich perinukleär im Zytoplasma nachweisbar (A und D). Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert, der diese blau erscheinen lässt (C). In der Negativkontrolle ist keine Fluoreszenz zu erkennen (B).

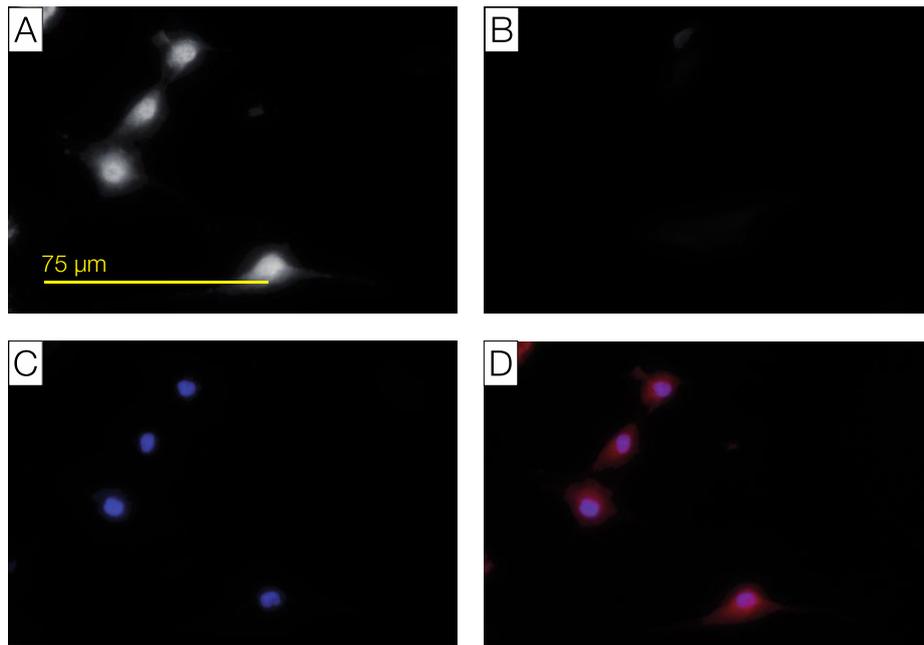


**Abb. 1:**

Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs aus OA-Knorpelgewebe

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

In Abbildung 2 ist der Adiponektinrezeptor erneut durch einen roten Fluoreszenzfarbstoff markiert worden (D). Die CPCs stammen jedoch nicht von einem Patienten mit OA sondern aus dem Knorpelgewebe eines Patienten mit RA. Die Verteilung der Rezeptorproteine in den RA-CPCs ist dem zuvor beschriebenen Lokalisationsmuster innerhalb der OA-CPCs sehr ähnlich. In dieser Nachweisreaktion sind die Zellkerne ebenfalls mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI markiert worden und erscheinen blau (C). Die Negativkontrolle zeigt keine Fluoreszenz (B).



**Abb. 2:**

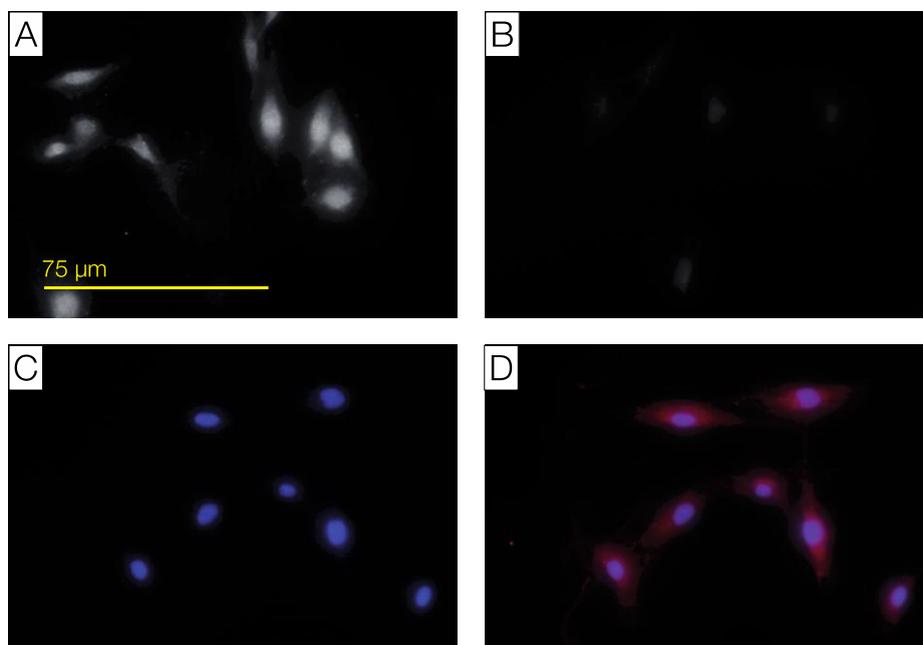
**Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs aus RA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

**3.1.2 Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs**

Die folgende Abbildung belegt die Expression des Leptinrezeptors innerhalb der CPCs aus OA-Knorpelgewebe. Der rote Fluoreszenzfarbstoff zeigt die markierten Rezeptorproteine. Vergleichbar mit dem Verteilungsmuster des

Adiponektinrezeptors sind auch die Leptinrezeptoren vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert. Die Rezeptorproteine weisen eine perinukleäre Lokalisation auf (A und D). Die Zellkerne sind durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau markiert (C). In der Negativkontrolle ist keine Fluoreszenz nachweisbar (B).

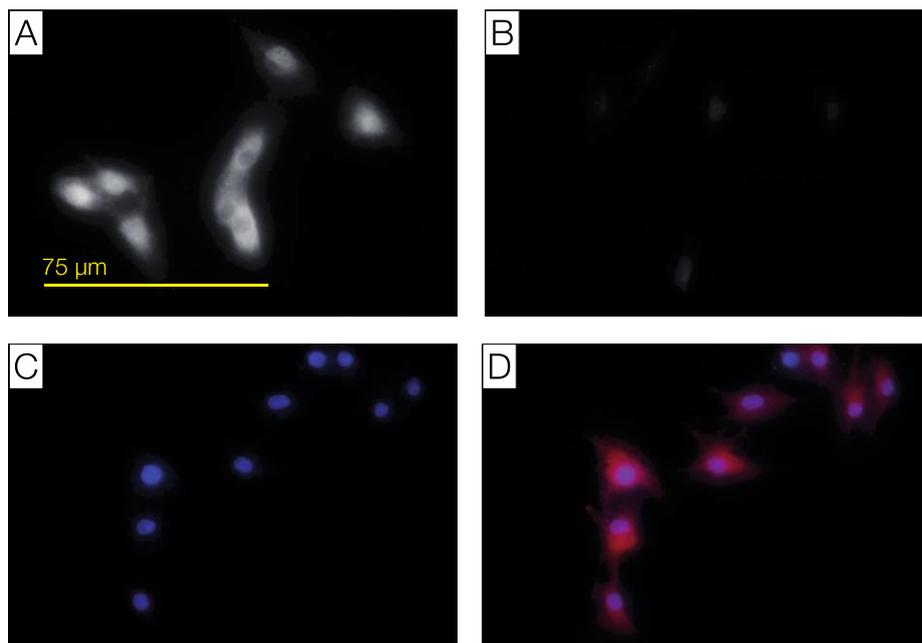


**Abb. 3:**

**Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs aus OA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

In dieser Abbildung ist der Leptinrezeptor innerhalb der CPCs aus dem Knorpelgewebe von Patienten dargestellt, die an RA leiden. Die Rezeptoren sind erneut mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die zellinterne Verteilung der Rezeptormoleküle ist mit der Rezeptorlokalisierung in den CPCs aus OA-Gewebe vergleichbar (A und D). Die Zellkerne sind mittels DAPI blau markiert (C). In der Negativkontrolle ist keine Fluoreszenz zu sehen (B).



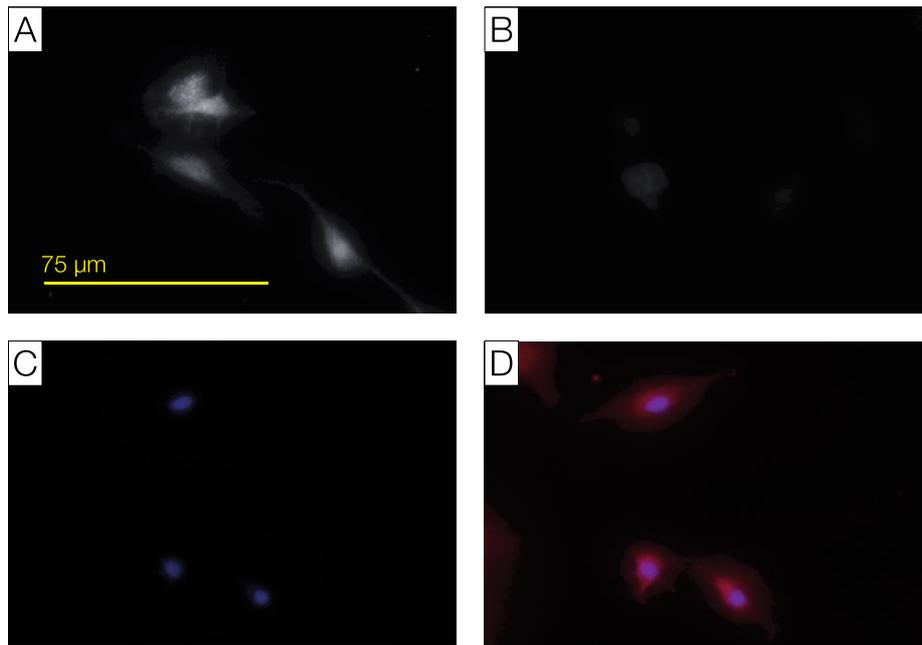
**Abb. 4:**

**Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs aus RA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

### **3.1.3 Immunzytochemische Darstellung von Adiponektin in CPCs**

Adiponektin ist mittels eines roten Fluoreszenzfarbstoffes markiert worden (D). Der Nachweis erfolgte an CPCs aus dem Knorpelgewebe von Patienten mit OA. Verglichen mit ihrem Rezeptorverteilungsmuster weisen die Adiponektinmoleküle jedoch eine veränderte Lokalisation auf. Sie sind weniger um den Kern zentriert, sondern liegen diffus im Zytoplasma verteilt vor (A und D). Durch die Markierung mit DAPI erscheinen die Zellkerne blau (C). Die leichte Fluoreszenz in der Negativkontrolle (B), die durch den Sekundärantikörper hervorgerufen wurde, ist bereits von der Fluoreszenz des Adiponectins abgezogen worden (A).



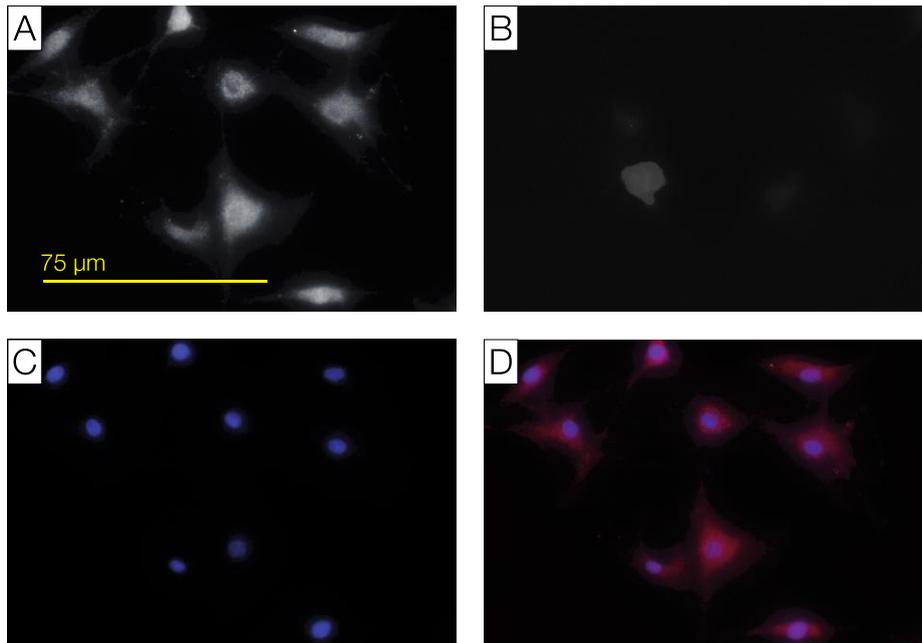
**Abb. 5:**

**Immunzytochemische Darstellung der Adiponektinmoleküle in CPCs aus OA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

Auch die folgende Abbildung zeigt das durch den Fluoreszenzfarbstoff rot markierte Adiponektin (D). Die Zellen stammen jedoch aus RA-Knorpelgewebe. In diesem Fall weist das Adiponektin, wie zuvor in den OA-CPCs, ein relativ gleichmäßiges zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf. Die Kerne fluoreszieren durch die Markierung mit DAPI blau (C). Die erneut

aufgetretene leichte Fluoreszenz des Sekundärantikörpers in der Negativkontrolle (B) wurde ebenfalls bereits von der Fluoreszenz des Adiponektins in der Übersichtsaufnahme abgezogen (A).



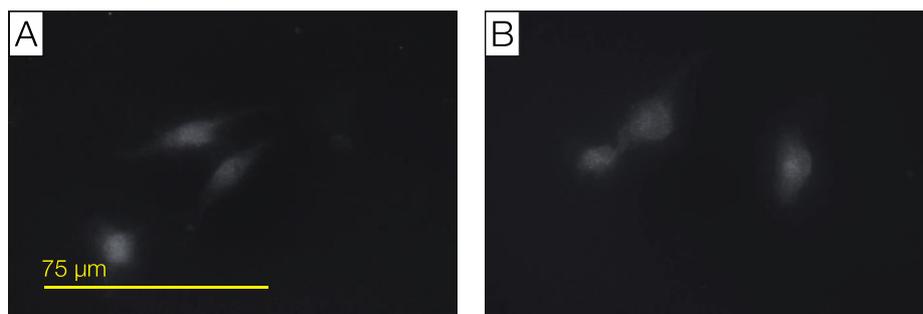
**Abb. 6:**

**Immunzytochemische Darstellung der Adiponektinmoleküle in CPCs aus RA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **D:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

### 3.1.4 Immunzytochemische Darstellung von Leptin in CPCs

Die folgende Abbildung zeigt die Fluoreszenzübersichtsaufnahme sowie die zugehörige Negativkontrolle von Leptin in OA-CPCs. Nach Subtraktion der Negativkontrolle von der Übersichtsaufnahme scheint in den OA-CPCs kein Leptin bzw. keine ausreichende Menge an Leptin vorhanden zu sein. Aus diesem Grund sind auch keine weiteren Bilder mit DAPI oder rotem Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen worden.

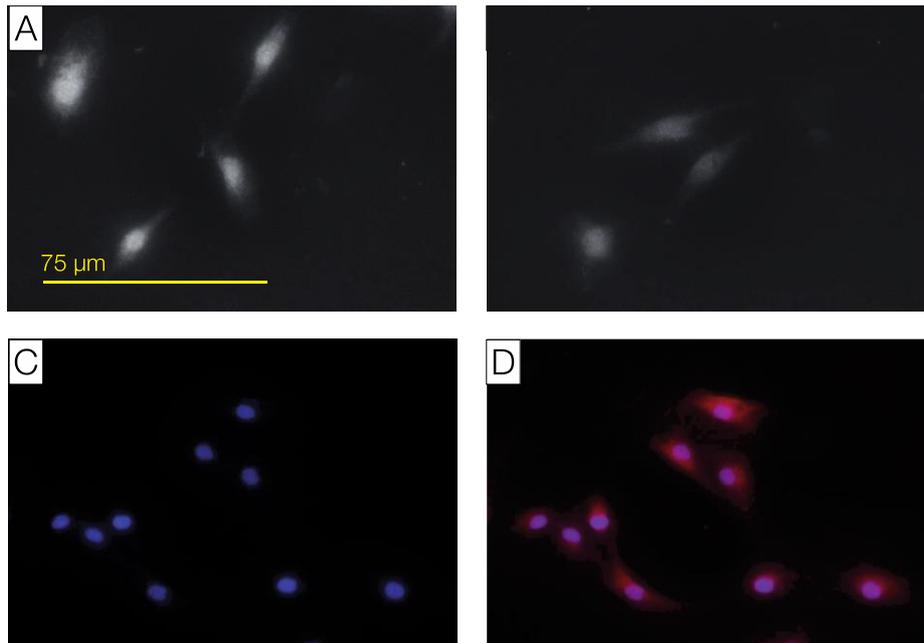


**Abb. 7:**

**Immunzytochemische Darstellung der Leptinmoleküle in CPCs aus OA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle.

Leptin wurde durch die Markierung mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht (D). Durch die Fluoreszenz in der Negativkontrolle (B), die bereits von der Fluoreszenzübersichtsaufnahme (A) subtrahiert worden ist, scheint in den CPCs aus RA-Gewebe nur eine sehr geringe Menge an Leptin vorhanden zu sein. Die Moleküle liegen diffus im Zytoplasma verteilt vor (A und D). Die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt (C).



**Abb. 8:**

**Immunzytochemische Darstellung der Leptinmoleküle in CPCs aus RA-Knorpelgewebe**

Der Messbalken gilt für alle folgenden Bilder. **A:** Fluoreszenzübersichtsaufnahme, **B:** Negativkontrolle, **C:** Markierung der Zellkerne mittels DAPI, **E:** Fluoreszenzmarkierung in roter Farbe und Überlagerung mit C.

### **3.2 Darstellung der Genexpressionsanalysen**

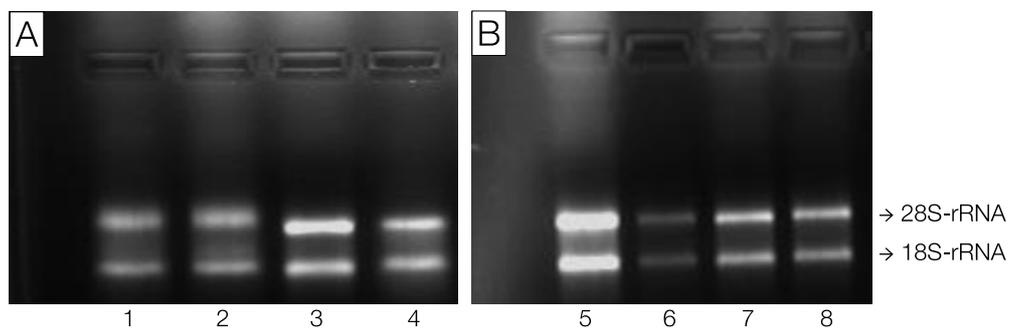
Im Rahmen der Stimulationsversuche wurden sowohl OA-CPCs als auch RA-CPCs für 48 Stunden mit Adiponektin (500 ng/ml) sowie mit Leptin (100 ng/ml) stimuliert. Daraufhin konnten mittels PCR-Untersuchungen Genexpressionsveränderungen in den CPCs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse werden in Form von Diagrammen dargestellt (Abb. 8, 9, 10 und 11).

Auf der x-Achse der Diagramme sind die stimulierten Zellreihen gegen ihre jeweilige Kontrollgruppe aufgetragen. Die y-Achse gibt das relative mRNA-Level an. Nach jedem Stimulationsversuch wurden die Genexpressionsveränderungen für IL1, IL6, IL10 und TNF $\alpha$  untersucht.

Die einzelnen Genexpressionsveränderungen sind in den nachfolgenden Diagrammen genauer dargestellt.

### 3.2.1 Kontrolle der RNA-Integrität als Vorbereitung der Genexpressionsuntersuchungen

Vor der Untersuchung der Genexpression mittels PCR wurde zunächst die Qualität der aus den chondrogenen Progenitorzellen gewonnenen RNA sichergestellt. Trägt man die RNA auf ein Agarose-Gel auf, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld Richtung Anode. Durch die Wanderungseigenschaften ergibt sich ein typisches Verteilungsmuster der ribosomalen RNA-Banden. Kennzeichnend für dieses Muster ist das Auftreten der 28S- und der 18S-Banden, die zeigen, dass die untersuchte RNA intakt ist.



**Abb. 9:**

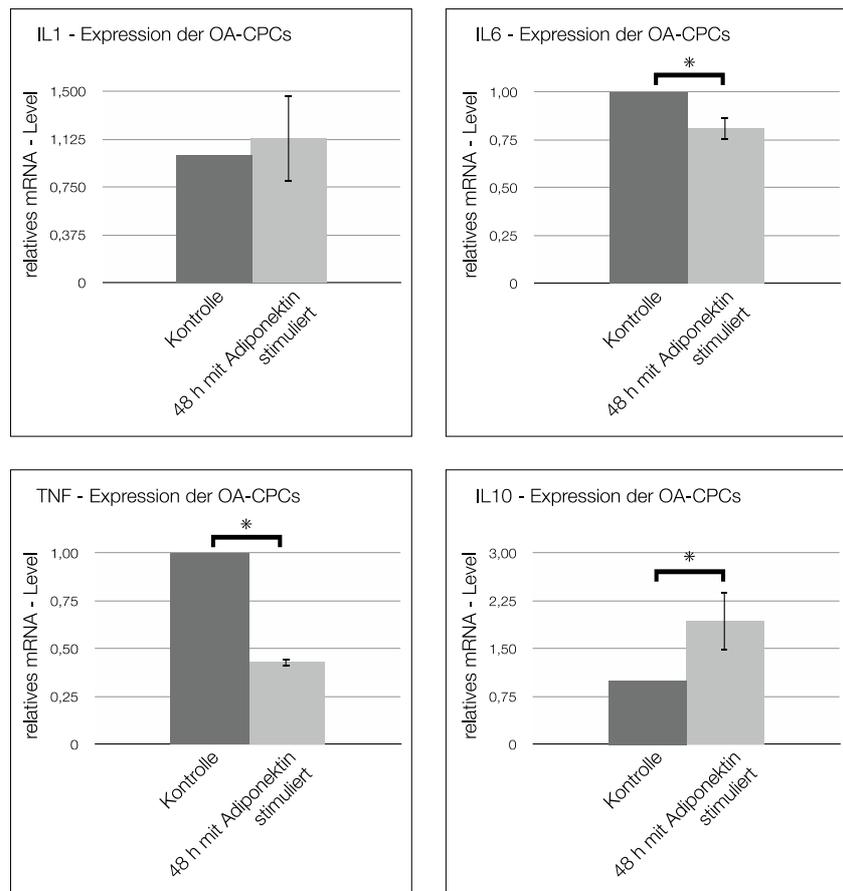
**Integritätskontrolle der RNA, die für die folgenden PCR-Untersuchungen verwendet wurde**

Die RNA ist mittels Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht worden. **1 bis 8** entsprechen der isolierten RNA der zu untersuchenden CPCs. **A:** RNA der CPCs aus osteoarthrotischem Knorpelgewebe, **1:** mit Adiponektin stimuliert, **2:** Kontrolle zu 2, **3:** mit Leptin stimuliert, **4:** Kontrolle zu 3. **B:** RNA der CPCs aus rheumatoid arthritischem Knorpelgewebe, **5:** mit Adiponektin stimuliert, **6:** Kontrolle zu 5, schwächere Banden, da weniger RNA einge-

setzt worden ist, **7**: mit Leptin stimuliert, **8**: Kontrolle zu 7. Intakte RNA ist im Agarose-Gel durch zwei deutlich getrennte Banden gekennzeichnet, die 28S- und die 18S-Bande ribosomaler RNA.

### 3.2.2 Genexpressionsveränderungen nach Stimulationsversuchen mit Adiponektin

Die Abbildung zeigt die Genexpressionsveränderungen der osteoarthrotischen CPCs nach der Stimulation mit Adiponektin. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die IL10-Expression signifikant erhöht. IL6 und TNF $\alpha$  werden, mit ihren Kontrollgruppen verglichen, vermindert exprimiert. Die IL1-Expression scheint geringfügig erhöht zu sein, dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant.



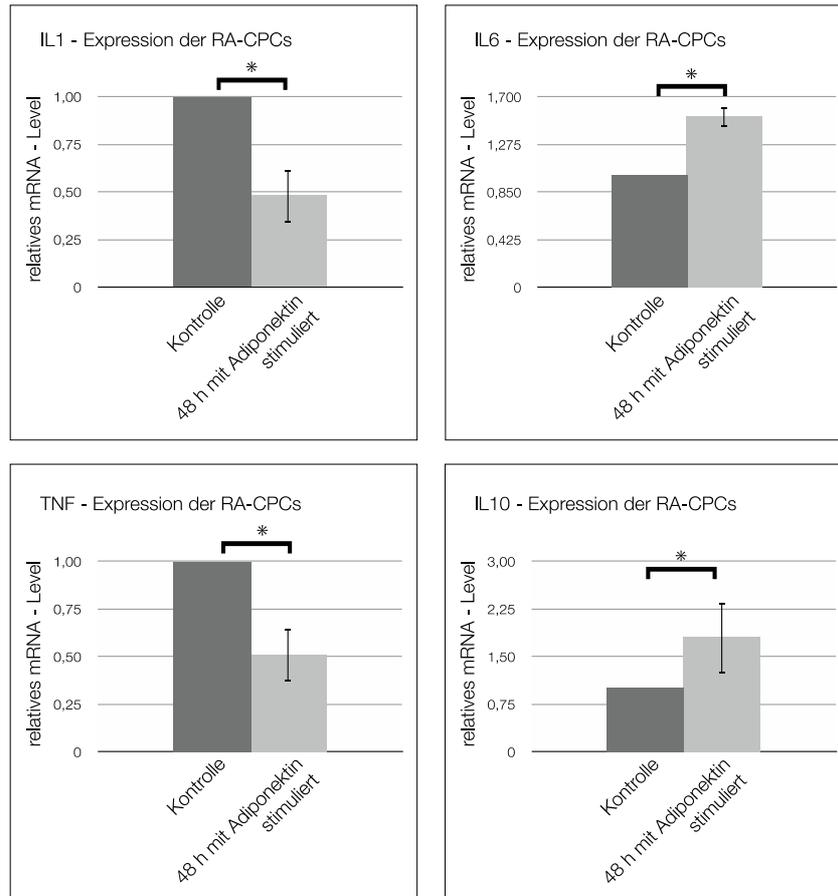
**Abb. 10:**

**Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in OA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Adiponektin**

Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an, \* = signifikanter Expressionsunterschied zum Referenzwert mit  $p < 0,05$ .

Die dunkelgrauen Säulen entsprechen dem mRNA-Level einer nicht stimulierten Zellreihe, die als Kontrollgruppe fungiert, während die hellgrauen Säulen die Veränderungen der Genexpression der stimulierten Zellen darstellen.

Abbildung 11 stellt die Genexpression der RA-CPCs nach der Stimulation mit Adiponektin dar. Vergleicht man die jeweiligen Ergebnisse mit der Expression in den entsprechenden Kontrollgruppen, kommt es zu einem Genexpressionsanstieg von IL10 und IL6, während die relativen mRNA-Level von IL1 und TNF $\alpha$  abfallen.



**Abb. 11:**

**Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in RA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Adiponektin**

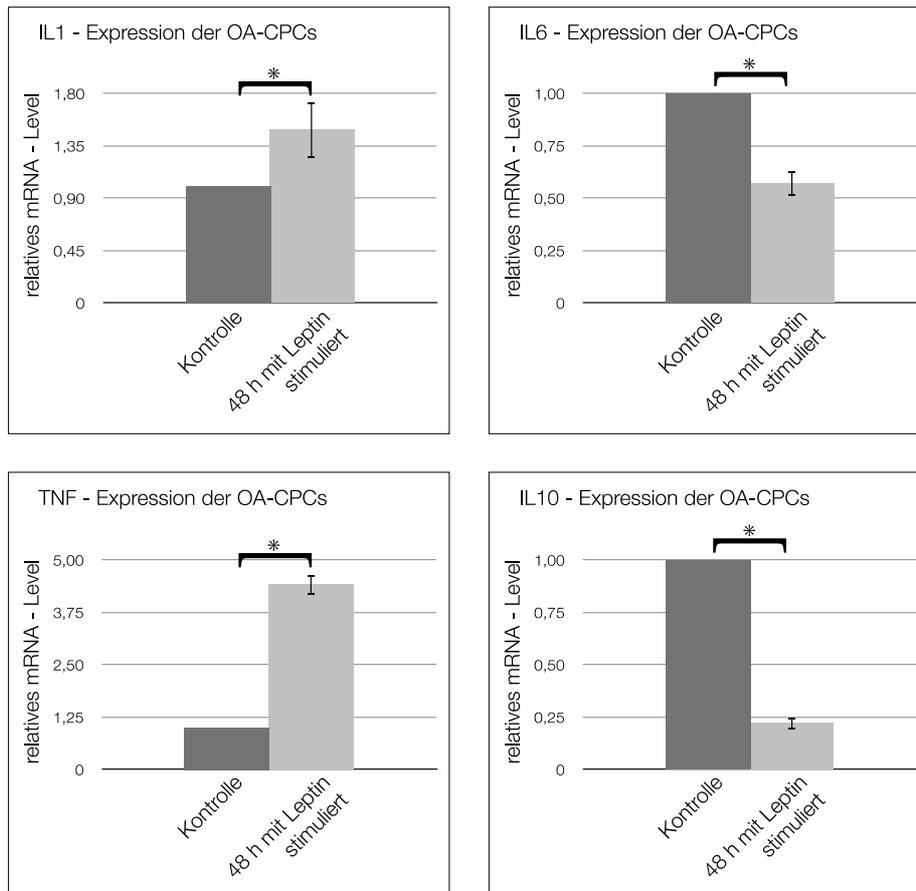
Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an, \* = signifikanter Expressionsunterschied zum Referenzwert mit  $p < 0,05$ .

Die dunkelgrauen Säulen entsprechen dem mRNA-Level einer nicht stimulierten Zellreihe, die als Kontrollgruppe fungiert, während die hellgrauen Säulen die Veränderungen der Genexpression der stimulierten Zellen darstellen.

**3.2.3 Genexpressionsveränderungen nach Stimulationsversuchen mit Leptin**

In der folgenden Abbildung sind die Genexpressionsveränderungen der OA-CPCs nach der Stimulation mit Leptin dargestellt. Nach 48 Stunden sind im

Vergleich zu den Kontrollgruppen ein deutlicher Abfall der IL10-Expression sowie eine verminderte IL6-Expression erkennbar. Im Gegensatz dazu werden IL1 und TNF $\alpha$  vermehrt exprimiert.



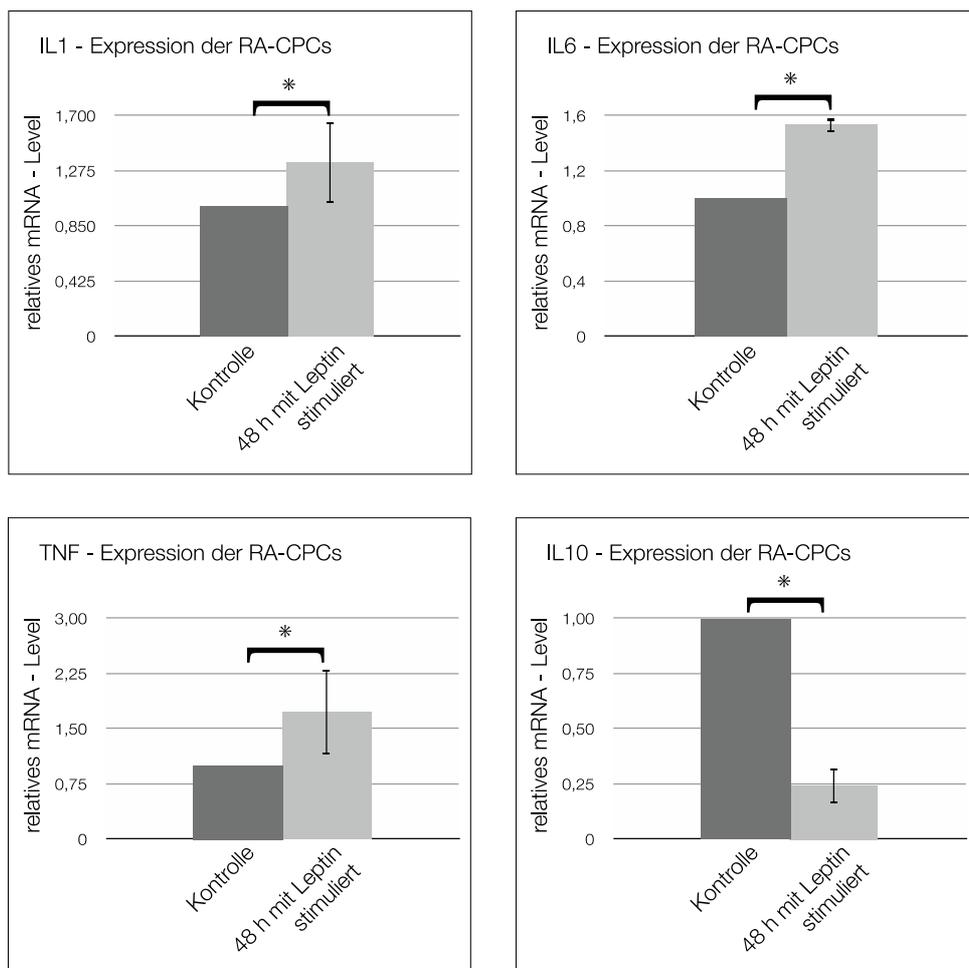
**Abb. 12:**

**Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in RA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Leptin**

Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an, \* = signifikanter Expressionsunterschied zum Referenzwert mit  $p < 0,05$ .

Die dunkelgrauen Säulen entsprechen dem mRNA-Level einer nicht stimulierten Zellreihe, die als Kontrollgruppe fungiert, während die hellgrauen Säulen die Veränderungen der Genexpression der stimulierten Zellen darstellen.

Abbildung 13 zeigt die Genexpressionsveränderungen der RA-CPCs nach der Stimulation mit Leptin. Vergleicht man die Genexpression mit den entsprechenden Kontrollgruppen, führt die Leptinstimulation zu einem deutlichen Abfall der IL10-Expression, während IL6, IL1 und TNF $\alpha$  vermehrt exprimiert werden.



**Abb. 13:**

**Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in RA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Leptin**

Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an, \* = signifikanter Expressionsunterschied zum Referenzwert mit  $p < 0,05$ .

Die dunkelgrauen Säulen entsprechen dem mRNA-Level einer nicht stimulierten Zellreihe, die als Kontrollgruppe fungiert, während die hellgrauen Säulen die Veränderungen der Genexpression der stimulierten Zellen darstellen.

### 3.2.4 Tabellarische Zusammenfassung der Genexpressionsveränderungen nach Adipozytokinstimulation

Adiponektin scheint sowohl in OA-CPCs als auch in RA-CPCs hauptsächlich anti-inflammatorisch zu wirken. Die Stimulation der zwei CPC-Reihen mit Leptin führt hingegen zur vermehrten Expression pro-inflammatorischer Mediatoren.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen noch einmal zusammengefasst.

		IL1	TNF $\alpha$	IL6	IL10
Adiponektin	OA	#	-	-	+
	RA	-	-	+	+
Leptin	OA	+	+	-	-
	RA	+	+	+	-

+ = Anstieg der Genexpression, - = Abfall der Genexpression, # = Ergebnis nicht signifikant

#### Tabelle 4:

##### Überblick über die Genexpressionsveränderungen nach Adipozytokinstimulation

Adiponektin bewirkt sowohl in den OA-CPCs als auch in den RA-CPCs eine verminderte Expression von TNF $\alpha$  und eine Expressionssteigerung von IL10. Die Stimulation mit Leptin

bewirkt den gegensätzlichen Effekt. Die Expression von TNF $\alpha$  steigt an, und IL 10 wird vermindert exprimiert. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Expression von IL1. Die Adiponektinstimulation der RA-CPCs führt zu einem Expressionsabfall von IL1. Das Ergebnis der Untersuchung der OA-CPCs ist leider nicht signifikant. Betrachtet man den Mediator IL6, entspricht die Expressionsveränderung unter Adiponektinstimulation dem Ergebnis der Leptinstimulation. Die IL6-Expression in den OA-CPCs ist vermindert, während es in den RA-CPCs zu einer Expressionssteigerung kommt.

## 4 Diskussion

Seit einigen Jahren wird davon ausgegangen, dass entzündliche Gelenkerkrankungen wie die OA und die RA nicht nur durch intraartikulär freigesetzte Entzündungsmediatoren gekennzeichnet sind. Zusätzlich zu den klassischen Markern entzündlicher Prozesse steigt nun auch die Bedeutung der Adipozytokine als Marker für Entzündungsgeschehen in diversen Gelenkstrukturen. Adipozytokine sind systemische Botenstoffe, die vom Fettgewebe produziert werden (Blüher und Mantzoros 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind vertretend für die Botenstoffe, die von den Adipozyten freigesetzt werden, Adiponektin und Leptin genauer betrachtet worden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Adipozytokinvermittelte Wirkung auf das Stoffwechselverhalten von CPCs. Die CPCs stellen eine besondere Zellpopulation mit Stammzellcharakter und einem hohen chondrogenen Potential dar (Koelling und Miosge 2009). Sie finden sich insbesondere im Reparaturgewebe menschlichen Gelenkknorpels und gelten als mögliche Grundbausteine für zukünftige regenerative Therapien.

Aufgrund der intraartikulär herrschenden Entzündungssituation bei vorliegender Gelenkerkrankung kommt es zur progressiven Knorpelzerstörung. Zusätzlich verlieren auch die CPCs durch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ihr Migrationspotential (Joos et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig versucht, die entzündungsmodulierende Wirkung von Adiponectin und Leptin auf CPCs zu beschreiben. Das

Ziel der Untersuchungen soll ein weiterer Erkenntnisgewinn zur Biologie dieser Progenitorzellen sein.

#### **4.1 Erörterung der immunzytochemischen Untersuchungen**

Anhand der immunzytochemischen Ergebnisse konnte das Vorkommen der Rezeptoren für die Adipozytokine Adiponektin und Leptin in CPCs gezeigt werden. Die Expression der spezifischen Rezeptoren beider Adipozytokine erfolgte sowohl in OA- als auch in RA-CPCs (siehe Abb. 1 bis 4). Ziel der Untersuchungen war es, anhand der immunzytochemischen Rezeptornachweise exemplarisch zu zeigen, dass Adiponektin und Leptin über Rezeptorproteine die Möglichkeit besitzen, mit den CPCs zu interagieren.

In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurde daraufhin das Vorkommen der Proteine Adiponektin und Leptin in CPCs immunzytochemisch untersucht. Adiponektin konnte in OA- sowie in RA-CPCs nachgewiesen werden (siehe Abb. 5 und 6), während die Darstellung von Leptin nur innerhalb der RA-CPCs möglich war (siehe Abb. 8). Diese Ergebnisse sollen beispielhaft verdeutlichen, dass Adiponektin und Leptin tatsächlich in den CPCs vorhanden sind.

Basierend auf dem bisherigen Erkenntnisgewinn ist folglich ein direktes Eingreifen der hier untersuchten Adipozytokine in den intra- und interzellulären Stoffwechsel der CPCs möglich.

## 4.2 Diskussion der Expression von Adiponektin- und Leptinrezeptoren im Knorpelgewebe

Studien belegen, dass die Wirkung von Adiponektin sowohl im humanen als auch im murinen Gewebe hauptsächlich über zwei Rezeptorsubtypen, den AdipoR1- und den AdipoR2-Rezeptor vermittelt wird (Kadowaki und Yamauchi 2005). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der *Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren*. Sie wirken jedoch *G-Protein*-ungekoppelt (Yamauchi et al. 2003). Des Weiteren konnte auch das Membranprotein T-Cadherin als potentieller Adiponektinrezeptor identifiziert werden (Parker-Duffen et al. 2013). Da T-Cadherin bislang jedoch nur innerhalb von Endothelien nachgewiesen worden ist, wird dieser Rezeptor im Folgenden nicht weiter beschrieben. Laut Chen et al. erfolgt die Expression des AdipoR1-Rezeptors vornehmlich im Knorpel- und Knochengewebe sowie im Synovium, während der AdipoR2-Rezeptor hauptsächlich in der Leber gezeigt werden konnte (Chen et al. 2006). Im Gegensatz zu dieser Untersuchung sind entsprechend einer Studie von Lago et al. beide Rezeptorsubtypen in den Chondrozyten des humanen Knorpelgewebes koexprimiert (Lago et al. 2008). Die Rezeptoren konnten ebenfalls innerhalb von Fibroblasten der Synovia aus OA- und RA-Gewebe nachweislich dargestellt werden (Ehling et al. 2006). Weiteren Diskussionsbedarf bieten die Expressionsveränderungen der Rezeptoren innerhalb von Chondrozyten bei OA- und RA-Gelenkveränderungen. In diesem Fall wurde im Rahmen der OA ei-

nerseits eine Abnahme der Rezeptordichte beschrieben (Wang et al. 2014). Kang et al. berichten andererseits jedoch von einer deutlichen Zunahme der Rezeptorexpression. So kann im Rahmen der Untersuchung geschädigter und gesunder Knorpelbereiche, verglichen mit der Zunahme des AdipoR2-Rezeptors, ein doppelt so starker Anstieg des AdipoR1-Rezeptors nachgewiesen werden. Der AdipoR2-Rezeptor zeigte in allen Knorpelschichten eine gleichmäßige Verteilung, während der AdipoR1-Rezeptor vermehrt in der superfiziellen Schicht des OA-Knorpelgewebes exprimiert wurde (Kang et al. 2010). Auch im Rahmen der RA konnten Expressionsveränderungen der Adiponektinrezeptoren beschrieben werden (Zuo et al. 2011). Insbesondere innerhalb der Fibroblasten der Synovia kam es laut der oben genannten Arbeitsgruppe zu einem Anstieg des AdipoR1-Rezeptors. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass dem AdipoR1-Rezeptor bezüglich der Progression entzündlicher Gelenkerkrankungen möglicherweise eine besondere Bedeutung zukommt. Anhand der immunzytochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gelang es, den AdipoR1-Rezeptor sowohl innerhalb der OA- als auch in RA-CPCs nachzuweisen. Trotz teils kontroverser Studienergebnisse bekräftigte die deutliche Rezeptordarstellung in der Immunzytochemie jedoch die Vermutung eines potenziellen Zusammenspiels von CPCs und Adiponektin im Rahmen von Entzündungsereignissen bei OA und RA. Inwiefern es aufgrund der Entzündungsreaktionen

zu einer Regulation der Rezeptordichte kommt, bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Leptin vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung der langen Isoform seiner Rezeptoren (Ob-Rezeptoren). Diese Isoform ist auf dem *diabetes* (db) -Gen kodiert und gehört zur Klasse I der Zytokinrezeptor-Superfamilie (Conde et al. 2013). Die Ob-Rezeptoren werden ubiquitär im Körper exprimiert. Unter anderem konnten sie laut Presle et al. sowohl im Blutplasma als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit OA nachgewiesen werden. Im Vergleich der beiden Kompartimente war die Rezeptorexpression im Plasma erhöht (Presle et al. 2006). Während der Untersuchung humaner Chondrozyten gelang es, die lange und auch eine kurze Isoform des Ob-Rezeptors im OA-Knorpelgewebe darzustellen (Figenschau et al. 2001, Simopoulou et al. 2007). Zusätzlich konnte von Muraoka et al. beschrieben werden, dass Fibroblasten aus der Synovia von Patienten mit RA ebenfalls Ob-Rezeptoren exprimieren (Muraoka et al. 2013). Otvos et al. untersuchten die Ob-Rezeptoren in verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Modellen. Beispielsweise isolierte die Arbeitsgruppe mononukleäre Zellen aus humanem peripheren Blut und induzierte mittels Leptinstimulation eine verstärkte Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die Zugabe eines Ob-Rezeptorantagonisten führte daraufhin zu einer signifikanten Reduktion der NF- $\kappa$ B-Expression. Des Weiteren zeigten Otvos

et al. anhand von Maus- und Rattenmodellen mit induzierter RA, dass die subkutane Injektion von Ob-Rezeptorantagonisten den entzündlichen Gelenkbefall und die Krankheitsausprägung deutlich reduzierte. Auf diese Weise wurde innerhalb der dargestellten Studie versucht, mit Hilfe von Rezeptoragonisten und -antagonisten, den Ob-Rezeptor als potentiellen Ansatz zur Therapie der RA zu nutzen (Otvos et al. 2011).

Laut der im oberen Abschnitt beschriebenen Literaturangaben gelang demnach bislang lediglich ein Nachweis des Ob-Rezeptors innerhalb von Chondrozyten aus OA-Gewebe. Da jedoch von Muraoka et al. sowie von Otvos et al. in RA-Modellen eine Leptin-induzierte Wirkung auf die Gelenkstrukturen beschrieben werden konnte, scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Ob-Rezeptoren ebenfalls in den Chondrozyten aus RA-Gewebe exprimiert werden. Anhand der vorliegenden immunzytochemischen Untersuchungsergebnisse ist es erstmalig gelungen, den Ob-Rezeptor in CPCs aus OA- und RA-Knorpelgewebe darzustellen.

Eine sich daraus ergebende potentielle Interaktion zwischen den CPCs und den Adipozytokinen Adiponektin und Leptin soll im Folgenden genauer betrachtet werden.

#### **4.3 Diskussion des Vorkommens der Adipozytokine Adiponektin und Leptin im Knorpelgewebe**

Adipozytokine gelten als Mediatorsubstanzen des Fettgewebes und werden hauptsächlich von ausdifferenzierten Fettgewebezellen produziert. Dem-

nach steigt die Serumkonzentration der meisten Adipozytokine proportional zum Grad der Adipositas an (Poonpet und Honsawek 2014). Adiponektin bildet jedoch eine Ausnahme. Dieses Adipozytokin wird mit zunehmendem Übergewicht vermindert ausgeschüttet. Im Serum stellt es bei einem gesunden normalgewichtigen Menschen mit 5 bis 10 µg/ml 0,01 % aller Serumproteine dar (Challa et al. 2010). Es wird angenommen, dass Adipozytokine eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Entzündungen spielen (Thijssen et al. 2014). Aufgrund dieser Erkenntnis ist bereits in mehreren Studien das Zusammenspiel von zirkulierenden Adipozytokinkonzentrationen und der Progression entzündlicher Gelenkerkrankungen untersucht worden. Im Rahmen des Krankheitsbildes der OA konnte ein deutlicher Anstieg der Serumlevel des Adiponektins nachgewiesen werden (de Boer et al. 2012). Diese Studie bestärkt die Vermutung einer entzündungsmodulierenden Wirkung von Adiponektin. Betrachtet man die Adiponektinlevel der Serien innerhalb der Untersuchungsgruppen, so fällt auf, dass die Adiponektinkonzentrationen der Frauen, im Vergleich zu denen der männlichen Patienten, im Durchschnitt erhöht sind (Perruccio et al. 2014). In Kombination mit der Tatsache, dass OA im weiblichen Geschlecht vermehrt aufzutreten scheint, stellt dies eine weitere Bestätigung der oben postulierten Vermutung dar. Schaffler et al. und Toussiro et al. konnten zeigen, dass Adiponektin sowohl im Rahmen der OA als auch bei RA nicht nur im Serum vorliegt sondern ebenfalls in geringen Mengen in der Synovialflüssigkeit nachweisbar ist. Die

zirkulierenden Adiponektinlevel schienen jedoch nicht repräsentativ für die Konzentrationen zu sein, die innerhalb der Gelenke vorherrschten (Schaffler et al. 2003, Toussiroot et al. 2007). Aufgrund der beschriebenen Konzentrationsdifferenz des Adiponektins zwischen dem Blutkompartiment und der Synovialflüssigkeit ergibt sich nun die Frage nach dessen Ursprungsort. Stellt das Fettgewebe tatsächlich die einzige Produktionsquelle des Adiponektins dar, so müsste das Adipozytokin, das laut der immunzytochemischen Ergebnisse dieser Arbeit in den CPCs vorliegt, über den Blutkreislauf und Diffusionsvorgänge in das Knorpelgewebe gelangen. Ein möglicher Grund für den Konzentrationsunterschied wäre das Molekulargewicht des Adiponektins (28 kDa), das eventuell zu einem eingeschränkten Transport über die Synovialmembran führt (Pajvani et al. 2003). Ein weiterer Erklärungsansatz für das unterschiedliche Verteilungsmuster des Adiponektins wäre die Annahme einer erhöhten Stoffwechelaktivität im OA-, bzw. RA-Knorpelgewebe, die mit einem vermehrten metabolischen Verbrauch des Adiponektins einherginge. Presle et al. konnten anhand der Untersuchung verschiedener Gelenkstrukturen die Produktion von Adiponektin innerhalb des Synoviums, des infrapatellaren Fettgewebes, des Meniskus, der Osteophyten sowie im Knorpel- und Knochengewebe darstellen (Presle et al. 2006). Der Nachweis einer intraartikulären Adiponektinsynthese könnte darauf hindeuten, dass die CPCs möglicherweise selbst die Fähigkeit besitzen, Adiponektin zu synthetisieren. Anhand der immunzytochemischen Aufnah-

men ist jedoch lediglich das Vorhandensein des Adipozytokins innerhalb der CPCs zu belegen. Auf welchem Weg das Adiponectin in die Zellen gelangt ist oder ob es von diesen selbst produziert wird, gilt es, in weiterführenden Untersuchungen noch zu erforschen.

Leptin gehört ebenfalls zur Gruppe der Adipozytokine und wird hauptsächlich durch die Zellen des Fettgewebes produziert (Zhang et al. 1994). Im Gegensatz zur Adiponektinkonzentration nimmt die Leptinfreisetzung jedoch proportional zum Übergewicht zu (Considine et al. 1996). Die Frage, ob ein Anstieg der Leptinlevel im Serum mit einem erhöhten Krankheitsgrad der OA bzw. der RA einhergeht, wird momentan noch kontrovers diskutiert (Cao et al. 2014, Massengale et al. 2012, Oner et al. 2014). Die in der Synovialflüssigkeit gemessenen Leptinkonzentrationen zeigten sowohl im Rahmen der OA als auch bei diagnostizierter RA einen deutlichen Anstieg (Lubbeke et al. 2013, Neumann et al. 2011). Vergleicht man die Konzentrationen von Adiponektin und Leptin im Blutplasma und in der Synovialflüssigkeit, so weisen diese ein gegensätzliches Verteilungsmuster auf. Presle et al. konnten nachweisen, dass die Adiponektinkonzentration im Plasma erhöht ist, während Leptin vermehrt in der Gelenkflüssigkeit vorliegt (Presle et al. 2006). Ein möglicher Konzentrationsunterschied von Adiponektin und Leptin in den CPCs konnte anhand der vorliegenden immunzytochemischen Darstellungen nicht quantifiziert werden. Der Untersuchungsschwerpunkt dieser Ar-

beit liegt auf dem Nachweis des Vorkommens der Adipozytokine im Knorpelgewebe und nicht auf der Bestimmung relativer Proteinmengen. Ähnlich zu der Adiponektinverteilung zwischen Blutkreislauf und Gelenkgewebe ist die Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit unabhängig von der zirkulierenden Leptinmenge zu bewerten. Auch in diesem Fall stellt sich die Frage nach dem Produktionsort des Adipozytokins, das mittels Immunzytochemie in den RA-CPCs dargestellt wurde. In humanen Chondrozyten konnte die Fähigkeit zur Leptinproduktion bereits nachgewiesen werden (Dumond et al. 2003). Zudem war es möglich, eine vermehrte Leptinsynthese der Chondrozyten im OA-Knorpelgewebe zu belegen. Es wurde bereits festgestellt, dass sowohl im Rahmen der OA als auch bei RA Entzündungsreaktionen für die Knorpeldegradation verantwortlich sind (Fraser et al. 2003, Tetlow et al. 2001). Zusätzlich wird angenommen, dass Adiponektin sowie Leptin eine entzündungsmodulatorische Wirkung besitzen, die es ihnen ermöglicht, in den Knorpelstoffwechsel einzugreifen (Neumann et al. 2011, Poonpet und Honsawek 2014). Basierend auf diesen Tatsachen scheint es durchaus wahrscheinlich zu sein, dass CPCs aus RA-Knorpelgewebe ebenso zur Leptinproduktion fähig sind. Anhand der immunzytochemischen Aufnahmen konnte dies nun erstmalig gezeigt werden.

Das negative Ergebnis der Immunzytochemie zur Leptindetektion in OA-CPCs wirft jedoch Fragen auf. Dem bisherigen Kenntnisstand entsprechend wäre ein positives Ergebnis zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung

könnten Mängel in der Durchführung der immunzytochemischen Reaktionen oder fehlerhaftes Probenmaterial gewesen sein. Da jedoch die gesamten Nachweisversuche von Leptin in OA-CPCs negativ ausfielen, während die Detektion in RA-CPCs stets erfolgreich war, erscheint dies als unwahrscheinlich. Es ist zu vermuten, dass die Leptinkonzentration in den OA-CPCs so gering war, dass diese durch den verwendeten Antikörper nicht detektiert werden konnte.

#### **4.4 Diskussion der Stimulationsversuche der CPCs mit Adiponektin und Leptin**

Die Stimulationsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bilden die Grundlage für die Untersuchung des entzündungsmodulatorischen Verhaltens der Adipozytokine im OA- und RA-Knorpelgewebe.

Seitdem das Fettgewebe als endokrines Organ identifiziert worden ist, wird den Adipozytokinen eine immer bedeutendere Rolle in diversen Stoffwechselprozessen zugeschrieben (Blüher und Mantzoros 2015). Sowohl Adiponektin als auch Leptin sind bereits vielfach für Stimulationsversuche genutzt worden, insbesondere um das entzündungsmodulatorische Verhalten der beiden Adipozytokine in unterschiedlichen Geweben zu beschreiben.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden CPCs aus OA- und RA-Knorpelgewebe mit den Adipozytokinen Adiponektin und Leptin stimuliert. Diese Stimulationsversuche sind die ersten, die an CPCs durchgeführt

wurden. Im Rahmen der Untersuchung anderer Zellreihen erfolgten jedoch bereits ähnliche Versuche.

Beispielsweise stimulierten Frommer et al. synoviale Fibroblasten, Lymphozyten, Endothelzellen und Chondrozyten aus RA-Gewebe mit Adiponektin, um dessen Wirkungsweise in den Effektorzellen bezüglich der Entstehung von Entzündungen genauer zu untersuchen. Die Adiponektinstimulation erfolgte mit 25 µg/ml über 15 Stunden (Frommer et al. 2010). In diesem Fall wurde die Zellstimulation mit einer sehr hohen Adiponektinkonzentration durchgeführt. Lee et al. versuchten mittels eines Stimulationsversuches den Zusammenhang zwischen Adiponektin und der Endothelzell- und Osteoblastenproduktion von IL6, IL8, VEGF und diversen MMPs darzustellen. Die Arbeitsgruppe stimulierte ihre Zellen über 24 Stunden, sowohl unter hypoxischen als auch unter Normalbedingungen. Die Stimulation erfolgte jeweils mit einer Adiponektinkonzentration von 1 µg/ml und 10 µg/ml (Lee et al. 2014). Im Rahmen eines weiteren Projekts gelang es Challa et al., die In-vitro-Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten direkt zu stimulieren. Für diesen Versuch wurden ATDC5-Zellen verwendet, eine chondrogene Zelllinie, die aus der Kultur von Teratomzellen gewonnen wird. Die Stimulation der Chondrozyten erfolgte über 24 Stunden, bzw. über 4, 7, 14 und 21 Tage in DMEM und FCS mit unterschiedlichen Konzentrationen an Adiponektin. Es wurde sowohl mit 0,1 µg/ml als auch mit 0,5 µg/ml und 1 µg/ml stimuliert (Challa et al. 2010). Die besten Ergebnisse zeigten sich bei

einer Konzentration von 0,5 µg/ml und einer Inkubationsdauer von weniger als vier Tagen. Ähnliche Parameter sind auch für die Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit verwendet worden. Die Stimulation der CPCs erfolgte über 48 Stunden und ebenfalls mit einer Adiponektinkonzentration von 0,5 µg/ml. Laut Presle et al. und Staikos et al. liegen die allgemeinen Serumkonzentrationen von Adiponektin bei Probanden mit OA zwischen 7 µg/ml und 11 µg/ml. In der Synovialflüssigkeit werden Werte von durchschnittlich 1 µg/ml bis 2 µg/ml gemessen (Presle et al. 2006, Staikos et al. 2013). In der Annahme, dass die Chondrozyten bzw. die CPCs das Adiponektin aus der Synovialflüssigkeit beziehen, scheint die Stimulation mit einer Adiponektinkonzentration von 0,5 µg/ml durchaus angemessen zu sein.

Die Wirkungsweise von Leptin und dessen Rolle im Entzündungsgeschehen des OA- und RA-Gelenkgewebes ist ebenfalls bereits anhand von Stimulationsversuche genauer untersucht worden. Einige dieser Versuche sollen im Folgenden exemplarisch dargestellt werden. Solomon et al. nutzten beispielsweise ein In-vivo-Mausmodell, um die Stoffwechselmechanismen von Leptin in Bezug auf das Körpergewicht und die Knochenstruktur zu erforschen. Die Wissenschaftsgruppe injizierte subkutan einen Leptinantagonisten in vier Wochen alte weibliche Mäuse und beobachtete drei Monate lang die induzierten Stoffwechsel- und Knochenveränderungen (Solomon et al. 2014). In einem anderen Projekt erfolgte die Leptinstimulation von Fib-

roblasten aus OA- und RA-Synovialgewebe (Tong et al. 2008). Außerdem wurde versucht, anhand der Stimulation mit Leptin, neue Erkenntnisse bezüglich der Veränderungen im Zytoskelett von Chondrozyten zu erlangen (Liang et al. 2011). Einen weiteren Stimulationsversuch mit einer chondrogenen Zelllinie führten Ohba et al. durch. Diese Arbeitsgruppe stimulierte Chondrozyten 30 Minuten bis 48 Stunden mit rekombinantem humanem Leptin (Ohba et al. 2010). Aufgrund der Erfahrungswerte bisheriger Studien betrug die Stimulationsdauer im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls 48 Stunden. Die Serumkonzentrationen von Leptin aus dem Blut von Probanden mit OA lagen laut Presle et al. und Staikos et al. zwischen 8 ng/ml und 31 ng/ml, während in der Synovialflüssigkeit derselben Patienten Werte zwischen 5 ng/ml und 19 ng/ml gemessen wurden (Presle et al. 2006, Staikos et al. 2013). Verglichen mit den minimalen Leptinkonzentrationen in der Synovialflüssigkeit, wären auch zur Stimulation der CPCs sehr kleine Mengen an Leptin benötigt worden. Diese geringen Konzentrationen hätten jedoch ein exaktes Pipettieren unmöglich gemacht. Demnach wurde im Rahmen der Stimulationsversuche dieser Arbeit mit einer Leptinkonzentration von 100 ng/ml gearbeitet. In anderen noch unveröffentlichten Untersuchungen sind chondrogene Zellreihen ebenfalls bereits erfolgreich mit ähnlichen Mengen an Leptin stimuliert worden (Kontakt mit Prof. Dr. Arie Gertler, The Hebrew University of Jerusalem, Institute of Biochemistry, Food Science and Nutrition, Rehovot, Israel).

Neben den Stimulationsversuchen, die an bereits ausdifferenzierten Chondrozyten oder Fibroblasten der Synovia durchgeführt wurden, gibt es bislang weder Veröffentlichungen zur Stimulation von CPCs mit Adiponektin noch mit Leptin. Durch ihr hohes Migrations- und Differenzierungspotential sowie das Muster ihrer Oberflächenmarker weisen die CPCs eine große Ähnlichkeit mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark auf (Koelling und Miosge 2009). Zur Stimulation von MSCs mit Adipozytokinen gibt es bereits mehrere Veröffentlichungen (Hess et al. 2005, Lee et al. 2009, Zhou et al. 2014). Diese und vergleichende Studien lassen vermuten, dass die Stimulation von CPCs mit Adipozytokinen ebenfalls möglich sein sollte. Aufgrund der Genexpressionsveränderungen, die in den Stimulationsversuchen induziert wurden und im Folgenden diskutiert werden sollen, scheinen Adiponektin und Leptin das Stoffwechselverhalten der CPCs durchaus zu beeinflussen. Um jedoch das genaue Ausmaß der Adipozytokinwirkung auf die CPCs bestimmen zu können, sind noch weitere Studien erforderlich.

#### **4.5 Diskussion der Genexpressionsveränderungen**

Nachdem die Untersuchungsergebnisse der qRT-PCR unter Verwendung der Pfaffl-Methode normalisiert worden waren, gelang es, in den stimulierten CPCs quantifizierbare Unterschiede der Genexpressionslevel nachzuweisen (Pfaffl 2001).

Fasst man die Messungen der Genexpression in den mit Adiponektin stimulierten CPCs zusammen, so zeigen sich sowohl anti-inflammatorische als auch pro-inflammatorische Eigenschaften des Adipozytokins im Stoffwechsel des geschädigten Knorpelgewebes. Das Ergebnis einer pro-inflammatorischen Wirkweise ist kohärent zu bisherigen Studien von Ouchi und Walsh, die Adiponektin ebenfalls als entzündungsprotektives Zytokin beschrieben (Ouchi und Walsh 2007). Innerhalb der Gelenke, insbesondere im Knorpelgewebe, wird die Rolle von Adiponektin jedoch bislang noch kontrovers diskutiert (Kang et al. 2010, Krysiak et al. 2012, Yusuf et al. 2011). Sowohl in den OA- als auch in den RA-CPCs konnte ein Abfall der Genexpression von TNF $\alpha$  gemessen werden. Die IL1-Expression in den OA-CPCs zeigte keine signifikanten Veränderungen, während in den RA-CPCs ein deutlicheres Absinken der Expressionslevel vermerkt wurde. Vergleichende Studien zeigen eine inhibierende Wirkung von Adiponektin auf die Genexpression von TNF $\alpha$  und IL1 im OA-Gewebe und bestätigen somit den Abfall der mRNA-Level von TNF $\alpha$  (Lee et al. 2008). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen wurde laut einer weiteren Studie zur Adipozytokinstimulation in RA-Synovialfibroblasten weder die Expression von IL1 noch von TNF $\alpha$  durch Adiponektin reguliert (Frommer et al. 2010). Interessanterweise zeigten die mRNA-Level von IL6 in den OA-CPCs der vorliegenden Immunzytochemie einen leichten Abfall, während in den RA-CPCs ein Anstieg vermerkt werden konnte. Ein Absinken der IL6-Genexpression im OA-Gewebe ist bislang noch

nicht nachgewiesen worden, während eine durch Adiponektin induzierte verstärkte IL6-Expression bereits mehrfach beschrieben wurde (Lago et al. 2008, Tang et al. 2007). Aufgrund der pro-inflammatorischen Eigenschaften von IL6 widerspricht dessen gesteigerte Genexpression nach der Zellstimulation der Vermutung, dass Adiponektin im Knorpelgewebe ausschließlich eine entzündungshemmende Wirkung besitzt. IL10 ist das vierte entzündungsmodulierende Protein, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels qRT-PCR untersucht wurde. Diesem anti-inflammatorischen Zytokin wird eine chondroprotektive Rolle im Knorpelgewebe und in der Synovia von Patienten mit OA zugesprochen (Jung et al. 2013, Vermeij et al. 2014). Nach der Stimulation mit Adiponektin zeigten die OA-CPCs sowie die RA-CPCs einen Anstieg der Genexpressionslevel von IL10 (siehe Abb. 9 und 10). Dieses Ergebnis würde die oben genannte Vermutung einer anti-inflammatorischen und knorpelerhaltenden Wirkung von Adiponektin unterstützen. Leider gibt es bislang noch keine Studien zur Interaktion von Adiponektin und IL10 in CPCs. Innerhalb humaner Makrophagen konnte jedoch bereits ein durch Adiponektin induziertes Ansteigen der IL10-Genexpression gezeigt werden (Kumada et al. 2004). Da Chondrozyten nachweislich zur IL10-Produktion fähig sind, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass CPCs ebenfalls IL10 freisetzen können (Iannone et al. 2001). Demnach wird die IL10-Produktion der CPCs durch Adiponektin gesteigert.

Die Genexpressionsveränderungen, die durch die Stimulation der CPCs mit Leptin hervorgerufen wurden, sind ebenfalls mittels qRT-PCR quantifiziert worden. Im Gegensatz zu den anscheinend sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Eigenschaften von Adiponektin, zeigt Leptin innerhalb der CPCs hauptsächlich eine pro-inflammatorische Wirkung. Diese entzündungsfördernden Eigenschaften von Leptin und dessen Fähigkeit, immunmodulatorisch in Stoffwechselforgänge einzugreifen, sind bekannt (Stofkova 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch erstmalig, dass Leptin auch mit CPCs aus geschädigtem Gelenkknorpel interagiert und pro-inflammatorisch in deren Stoffwechselprozesse eingreift. Trotz dieser Tatsache wird in einigen Veröffentlichungen ebenfalls berichtet, dass Leptin mit einer Reduktion von Knorpelschäden einhergeht (Rho et al. 2009). Durch die Leptinstimulation kommt es sowohl in den OA-CPCs als auch in den RA-CPCs zu einem Anstieg der Genexpression von IL1. Vergleichende Studien belegen die gesteigerte IL1-Expression im Rahmen der OA (Conde et al. 2013, Simopoulou et al. 2007). Bisher gibt es keine veröffentlichten Untersuchungen hinsichtlich der RA zur Leptin-induzierten Expression von IL1. Die Konzentration dieses pro-inflammatorischen Zytokins ist im Rahmen der RA erhöht. Zusätzlich wird IL1 eine Schlüsselrolle in der Krankheitsprogression der RA zugeschrieben (Schiff 2000). Diese Tatsachen unterstützen das Ergebnis einer verstärkten IL1-Expression in den RA-CPCs. Inte-

ressanterweise führte die Stimulation der CPCs mit Leptin erneut zu einem Abfall der IL6-Expression in den OA-CPCs und zu einer verstärkten Genexpression von IL6 in den RA-CPCs. Diese Veränderung der mRNA-Level war bereits nach der Stimulation mit Adiponektin gemessen worden. Studien von Vuolteenaho et al. beschreiben hingegen einen von Leptin hervorgerufenen Expressionsanstieg von IL6 im OA-Knorpelgewebe und geben keine Auskunft über mögliche Expressionsveränderungen im RA-Gewebe (Vuolteenaho et al. 2009). Bezüglich der Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  ergaben die qRT-PCR-Untersuchungen sowohl in den OA-CPCs als auch in den RA-CPCs einen Anstieg der Genexpression. Zum aktuellen Zeitpunkt existieren keine veröffentlichten Studien, die dieses Ergebnis bestätigen könnten. Die Literaturangaben zu Adipositas-induzierten Entzündungsreaktionen bei Patienten mit RA sind ebenfalls sehr gering. Tsuchida et al. verglichen die Zytokinkonzentrationen zwischen dem Gelenkgewebe und der Synovialflüssigkeit. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass innerhalb der Gelenke von Patienten mit symptomatischen Knorpeldefekten eine 10- bis 100-fach erhöhte Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen wie IL1, IL6 und TNF $\alpha$  vorliegt (Tsuchida et al. 2014). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zytokine innerhalb der Gelenke produziert werden. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Leptin zeigten dessen Fähigkeit, im Rahmen der RA Monozyten und Makrophagen zur Proliferation anzuregen und gleichzeitig die Produktion von IL1, IL6 und TNF $\alpha$  zu indu-

zieren (Stavropoulos-Kalinoglou et al. 2011). Außerdem ist Leptin ebenfalls in der Lage, in den Stoffwechsel von Chondrozyten einzugreifen (Otero et al. 2003). Unter Berücksichtigung der oben genannten Fakten werden die bisher beschriebenen Ergebnisse zur Quantifizierung der Genexpressionsveränderungen weiter belegt. In den Untersuchungen zur Expression des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL10 zeigten die Resultate in den OA-CPCs sowie in den RA-CPCs eine deutliche Reduktion der IL10-Expression. Eine Interaktion von Leptin und IL10 ist bislang lediglich innerhalb von Studien zur Gewichtsreduktion untersucht worden. Diese Studien beschreiben ein gegensätzliches Verhalten von Leptin und IL10. Ein Anstieg von Leptin ging stets mit einem Abfall der IL10-Konzentration einher und umgekehrt (Jung et al. 2008, Phillips et al. 2012). Daraus resultierend bekräftigen diese Ergebnisse den Abfall der Expression von IL10, der nach der Stimulation mit Leptin gemessen wurde.

In den Untersuchungen dieser Arbeit induziert Adiponektin sowohl die Expression pro-inflammatorischer als auch die Freisetzung anti-inflammatorischer Signalproteine in den OA- und RA-CPCs. Die Genexpression von TNF $\alpha$  wird reduziert und die IL10-Expression steigt an. Gleichzeitig sind die Expressionsveränderungen von IL1 und IL6 jedoch nicht einheitlich. In der Literatur wird die Wirkungsweise von Adiponektin im Knorpelgewebe ebenfalls kontrovers diskutiert, obwohl sich eine Tendenz abzeichnet, die

dem Adipozytokin vermehrt pro-inflammatorische Eigenschaften zuspricht (Chen et al. 2006, Conde et al. 2013).

Leptin weist gemäß den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sowohl in den OA-CPCs als auch in den RA-CPCs hauptsächlich pro-inflammatorische Eigenschaften auf. IL1 und TNF $\alpha$  werden verstärkt exprimiert, während es zu einem Abfall der IL10-Expression kommt. Diese entzündungsfördernde Wirkung von Leptin im Rahmen von Gelenkerkrankungen wird auch in der Literatur beschrieben (Toussiroot et al. 2007).

#### **4.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse und therapeutische Ausblicke**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der entzündungsmodulierenden Adipozytokine Adiponektin und Leptin auf humane CPCs untersucht. Den CPCs wird eine bedeutende Rolle hinsichtlich neuer Therapieoptionen zugesprochen, die eine zukünftige Regeneration hyalinen Knorpelgewebes ermöglichen könnten. Dies würde einen großen Fortschritt in der Behandlung von Gelenkerkrankungen wie der OA und der RA darstellen. Dementsprechend ist es von besonderem Interesse, die Biologie der Progenitorzellen sowie deren Interaktion mit den Botenstoffen im menschlichen Stoffwechsel genauer zu erforschen. Die Adipozytokine stellen das metabolische Bindeglied zwischen entzündlichen Stoffwechselerkrankungen und Gelenkschädigungen wie OA und RA dar. Seit der Entdeckung der Adipozytokine hat sich das Verständnis hinsichtlich der Funktion des weißen Fettgewebes

grundlegend verändert. In den letzten Jahren sind bereits viele Studien zur Identifikation neuer Adipozytokine und ihrer Signalwege durchgeführt worden. Resultierend aus den Untersuchungen dieser Arbeit kann Leptin in CPCs aus geschädigtem Knorpelgewebe die Aufgabe eines proinflammatorischen Zytokins zugewiesen werden, während Adiponektin im Gelenkknorpel sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Reaktionen hervorruft. Würde es gelingen, die Rolle der Adipozytokine und deren Zusammenspiel mit den CPCs im Pathomechanismus der entzündlichen Gelenkerkrankungen genauer zu beschreiben, könnte dies einen möglichen Behandlungsansatz für zukünftige pharmakologische Therapieoptionen darstellen. Im Rahmen der RA wird eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie bereits erfolgreich eingesetzt. Zusätzlich stellen die Adipozytokine einen möglichen Angriffspunkt im Wirkmechanismus der Progenitorzellen dar, der als Grundbaustein für die Entwicklung einer regenerativen Therapie genutzt werden könnte. Um dieses Ziel weiterhin zu verfolgen, müsste zunächst die Auswirkung der Entzündungsreaktionen auf das Differenzierungsverhalten der CPCs untersucht werden. Die genaue Rolle der Interaktion von CPCs und Adipozytokinen im Pathomechanismus und in der Progression von Gelenkerkrankungen ist noch zu definieren. Letztendlich stellt die Bildung von mechanisch stabilem und biologisch intaktem hyalinen Knorpelgewebe zur Heilung von Knorpelschäden weiterhin eine große Herausforderung dar. Bevor den Ergebnissen dieser Arbeit eine klinische Bedeutung zukommen kann, sind noch viele zu-

künftige Studien und große Fortschritte zum Verständnis der zellbiologischen Zusammenhänge im Knorpelgewebe notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Osteoarthrose und rheumatoide Arthritis gelten als zwei der meist verbreiteten Gelenkerkrankungen in den Industrienationen (Reginster und Khaltaev 2002). Der Begriff „Osteoarthritis“ wird bislang nur im englischsprachigen Raum genutzt und impliziert das Vorliegen einer Entzündungsreaktion. Inzwischen ist es eine allgemein anerkannte Tatsache, dass das Krankheitsbild der OA tatsächlich stets mit einer geringgradigen Gelenkentzündung einhergeht (de Lange-Brokaar et al. 2012). Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass auch Mediatorsubstanzen aus dem Fettgewebe wie Adipozytokine, z.B. Adiponektin und Leptin, am Entzündungsprozess beteiligt sind (Scotece et al. 2011). Die RA ist eine autoimmun bedingte chronische Gelenkerkrankung. In den durch die RA geschädigten Knorpelbereichen konnten ebenfalls Adipozytokine nachgewiesen werden (Del Prete et al. 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist untersucht worden, inwiefern sich die Adipozytokine Adiponektin und Leptin auf das Stoffwechselverhalten von CPCs und damit auf die Knorpeldegradation und eine mögliche Geweberegeneration im erkrankten Gelenk auswirken. Anhand immunzytochemischer Aufnahmen wurden erstmalig die Rezeptoren für Adiponektin und Leptin in CPCs nachgewiesen und gezeigt, dass auch die beiden Proteine selbst in den CPCs vorhanden sind. Daraufhin erfolgte die Stimulation der isolierten Progenitor-Zellen mit den beiden Adipozytokinen, um anschließend mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Expression von IL1, IL6,

TNF $\alpha$  und IL10 in den CPCs zu bestimmen. Eine Veränderung in der Interleukin- und TNF $\alpha$ - Expression sollte zeigen, ob das jeweilige Adipozytokin eine pro- oder eine anti-inflammatorische Zellantwort provoziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Adiponektin sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Reaktionen im Knorpelgewebe induziert, während sich Leptin hauptsächlich entzündungsfördernd auf den Stoffwechsel der CPCs auswirkt. Die CPCs stammten aus dem erkrankten Knorpelgewebe von Patienten mit OA sowie mit RA. Dies ermöglichte einen Vergleich der beiden Krankheitsbilder hinsichtlich der Adipozytokin-induzierten Entzündungsreaktionen. Interessanterweise zeigten sich jedoch keine bedeutsamen erkrankungsspezifischen Unterschiede in den Adipozytokin-induzierten Genexpressionveränderungen der CPCs.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs aus OA-Knorpelgewebe

32

Abbildung 2: Immunzytochemische Darstellung des Adiponektinrezeptors in CPCs aus RA-Knorpelgewebe

33

Abbildung 3: Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs aus OA-Knorpelgewebe

34

Abbildung 4: Immunzytochemische Darstellung des Leptinrezeptors in CPCs aus RA-Knorpelgewebe

35

Abbildung 5: Immunzytochemische Darstellung der Adiponektinmoleküle in CPCs aus OA-Knorpelgewebe

36

Abbildung 6: Immunzytochemische Darstellung der Adiponektinmoleküle in CPCs aus RA-Knorpelgewebe

37

Abbildung 7: Immunzytochemische Darstellung der Leptin-

	moleküle in CPCs aus OA-Knorpelgewebe	
38		
Abbildung 8:	Immunzytochemische Darstellung der Leptin- moleküle in CPCs aus RA-Knorpelgewebe	
39		
Abbildung 9:	Integritätskontrolle der RNA, die für die folgenden PCR-Untersuchungen verwendet wurde	41
Abbildung 10:	Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in OA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Adiponektin	42
Abbildung 11:	Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in RA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Adiponektin	43
Abbildung 12:	Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in OA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Leptin	
44		
Abbildung 13:	Relative Genexpressionslevel für IL1, TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 in RA-CPCs nach 48-stündiger Stimulation mit Leptin	
44		

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer, die zur Durchführung der PCR verwendet wurden	19
Tabelle 2:	Pipettierschema des PCR-Mastermix-Ansatzes	27
Tabelle 3:	RT-PCR-Protokoll	28
Tabelle 4:	Überblick der Genexpressionsveränderungen nach Adipozytokinstimulation	46

## 7 Literaturverzeichnis

Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B (2005): Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 1263-7

Berenbaum F (2004): Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16, 616-22

Bluher M, Mantzoros CS (2015): From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 64, 131-145

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47, 477-86

Buechler C, Wanninger J, Neumeier M (2010): Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett* 584, 4280-6

Cao Y, Stannus OP, Aitken D, Cicuttini F, Antony B, Jones G, Ding C (2014): Cross-sectional and longitudinal associations between systemic, subchondral bone mineral density and knee cartilage thickness in older adults with or without radiographic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 73, 2003-9

Challa TD, Rais Y, Ornan EM (2010): Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 323, 282-91

Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F (2013): Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta Histochem* 115, 692-7

Chen TH, Chen L, Hsieh MS, Chang CP, Chou DT, Tsai SH (2006): Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1762, 711-8

Codreanu C, Damjanov N (2015): Safety of biologics in rheumatoid arthritis: data from randomized controlled trials and registries. *Biologics* 9, 1-6

Conde J, Scotece M, Gomez R, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O (2011): Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors* 37, 413-20

Conde J, Scotece M, Lopez V, Gomez R, Lago F, Pino J, Gomez-Reino JJ, Gualillo O (2013): Adipokines: novel players in rheumatic diseases. *Discov Med* 15, 73-83

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334, 292-5

Cucchiaroni M, Madry H, Guilak F, Saris DB, Stoddart MJ, Koon Wong M, Roughley P (2014): A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 27, 12-6

de Boer TN, van Spil WE, Huisman AM, Polak AA, Bijlsma JW, Lafeber FP, Mastbergen SC (2012): Serum adipokines in osteoarthritis; comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 846-53

de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, Huizinga TW, Kloppenburg M (2012): Synovial inflammation, immune

cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 1484-99

Del Prete A, Salvi V, Sozzani S (2014): Adipokines as potential biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2014, 425068

Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottie P (2003): Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48, 3118-29

Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, Tarner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Scholmerich J (2006): The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 176, 4468-78

Fantuzzi G (2005): Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115, 911-9; quiz 920

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996): Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307-10

Fiaschi T, Magherini F, Gamberi T, Modesti PA, Modesti A (2014): Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function. *Cell Mol Life Sci* 71, 1917-25

Figenschau Y, Knutsen G, Shahazeydi S, Johansen O, Sveinbjornsson B (2001): Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 190-7

Fraser A, Fearon U, Billingham RC, Ionescu M, Reece R, Barwick T, Emery P, Poole AR, Veale DJ (2003): Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis Rheum* 48, 3085-95

Friedman JM, Halaas JL (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-70

Frommer KW, Zimmermann B, Meier FM, Schroder D, Heil M, Schaffler A, Buchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S (2010): Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62, 2886-99

Ghosh P, Cheras PA (2001): Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 693-709

Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, Dieguez C, Gualillo O (2009): Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *J Mol Endocrinol* 43, 11-8

Grogan SP, Chen X, Sovani S, Taniguchi N, Colwell CW, Jr., Lotz MK, D'Lima DD (2014): Influence of cartilage extracellular matrix molecules on cell phenotype and neocartilage formation. *Tissue Eng Part A* 20, 264-74

Hess R, Pino AM, Rios S, Fernandez M, Rodriguez JP (2005): High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem* 94, 50-7

Houard X, Goldring MB, Berenbaum F (2013): Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 15, 375

Hunter DJ, Felson DT (2006): Osteoarthritis. *Bmj* 332, 639-42

Hunter DJ, Schofield D, Callander E (2014): The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 437-41

Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ (2002): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 564-72

Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Cantatore FP, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G (2001): Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 19, 139-45

Johnson VL, Hunter DJ (2014): The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28, 5-15

Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE (2013): Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 15, R119

Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK (2008): Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem* 19, 371-5

Jung YK, Kim GW, Park HR, Lee EJ, Choi JY, Beier F, Han SW (2013): Role of interleukin-10 in endochondral bone formation in mice: anabolic effect via the bone morphogenetic protein/Smad pathway. *Arthritis Rheum* 65, 3153-64

Kadowaki T, Yamauchi T (2005): Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26, 439-51

Kang EH, Lee YJ, Kim TK, Chang CB, Chung JH, Shin K, Lee EY, Lee EB, Song YW (2010): Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther* 12, R231

Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR (2005): Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 52, 128-35

Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324-35

Koelling S, Miosge N (2010): Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62, 1077-87

Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1399-405

Korkmaz C (2012): Response to 'Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways'. *Arthritis Res Ther* 14, 402

Koskinen A, Juslin S, Nieminen R, Moilanen T, Vuolteenaho K, Moilanen E (2011): Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Res Ther* 13, R184

Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M, Chico A (1996): Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 111-25

Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B (2012): The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr* 51, 513-28

Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N (2004): Adiponectin specifically increased

tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109, 2046-9

Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS (2006): Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 18, 64-73

Kyburz D, Gabay C, Michel BA, Finckh A (2011): The long-term impact of early treatment of rheumatoid arthritis on radiographic progression: a population-based cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 50, 1106-10

Lago R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O (2008): A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1101-9

Lard LR, Visser H, Speyer I, vander Horst-Bruinsma IE, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JM (2001): Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 111, 446-51

Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim JB (2009): Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 27, 2254-62

Lee P, Rooney PJ, Sturrock RD, Kennedy AC, Dick WC (1974): The etiology and pathogenesis of osteoarthrosis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 3, 189-218

Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Lee SK (2008): Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* 37, 260-8

Lee YA, Ji HI, Lee SH, Hong SJ, Yang HI, Chul Yoo M, Kim KS (2014): The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human

endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints. *Exp Mol Med* 46, e72

Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB (2011): Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann N Y Acad Sci* 1240, 32-7

Liang J, Feng J, Wu WK, Xiao J, Wu Z, Han D, Zhu Y, Qiu G (2011): Leptin-mediated cytoskeletal remodeling in chondrocytes occurs via the RhoA/ROCK pathway. *J Orthop Res* 29, 369-74

Loeser RF (2008): Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8, 303-6

Loeser RF (2006): Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 54, 1357-60

Lubbeke A, Finckh A, Puskas GJ, Suva D, Ladermann A, Bas S, Fritschy D, Gabay C, Hoffmeyer P (2013): Do synovial leptin levels correlate with pain in end stage arthritis? *Int Orthop* 37, 2071-9

Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J (2006): The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* 7, 52

Ma VY, Chan L, Carruthers KJ (2014): Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain. *Arch Phys Med Rehabil* 95, 986-995.e1

Malemud CJ (2010): Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. *Drugs Aging* 27, 95-115

Massengale M, Reichmann WM, Losina E, Solomon DH, Katz JN (2012): The relationship between hand osteoarthritis and serum leptin concentration in participants of the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Res Ther* 14, R132

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW (1998): Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 1145-58

Muraoka S, Kusunoki N, Takahashi H, Tsuchiya K, Kawai S (2013): Leptin stimulates interleukin-6 production via janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 31, 589-95

Nagase H, Kashiwagi M (2003): Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 5, 94-103

Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Muller-Ladner U (2011): Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum* 63, 1159-69

Nilsson O, Parker EA, Hegde A, Chau M, Barnes KM, Baron J (2007): Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *J Endocrinol* 193, 75-84

Ohba S, Lanigan TM, Roessler BJ (2010): Leptin receptor JAK2/STAT3 signaling modulates expression of Frizzled receptors in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 1620-9

Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM (1999): Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* 10, 161-6

Oner SY, Volkan O, Oner C, Mengi A, Direskeneli H, Tasan DA (2014): Serum Leptin levels do not correlate with disease activity in Rheumatoid Arthritis. *Acta Reumatol Port*,

Otero M, Gomez Reino JJ, Gualillo O (2003): Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: in vitro effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum* 48, 404-9

Otvos L, Jr., Shao WH, Vanniasinghe AS, Amon MA, Holub MC, Kovalszky I, Wade JD, Doll M, Cohen PL, Manolios N (2011): Toward understanding the role of leptin and leptin receptor antagonism in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Peptides* 32, 1567-74

Ouchi N, Walsh K (2007): Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 380, 24-30

Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE (2003): Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278, 9073-85

Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, Kikuchi R, Tigges U, Yoshida S, Denzel MS, Ranscht B, Walsh K (2013): T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. *J Biol Chem* 288, 24886-97

Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, Crow MK (2007): Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 516-23

Perruccio AV, Mahomed NN, Chandran V, Gandhi R (2014): Plasma adipokine levels and their association with overall burden of painful joints among individuals with hip and knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 41, 334-7

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45

Phillips MD, Patrizi RM, Cheek DJ, Wooten JS, Barbee JJ, Mitchell JB (2012): Resistance training reduces subclinical inflammation in obese, postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc* 44, 2099-110

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S (2001): Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33

Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ (1996): Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Orthop Res* 14, 681-9

Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191 ( Pt 1), 1-13

Poonpet T, Honsawek S (2014): Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J Orthop* 5, 319-27

Presle N, Pottie P, Dumond H, Guillaume C, Lopicque F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B (2006): Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 690-5

Reginster JY, Khaltaev NG (2002): Introduction and WHO perspective on the global burden of musculoskeletal conditions. *Rheumatology (Oxford)* 41 Supp 1, 1-2

Rho YH, Solus J, Sokka T, Oeser A, Chung CP, Gebretsadik T, Shintani A, Pincus T, Stein CM (2009): Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 1906-14

Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Scholmerich J, Muller-Ladner U, Gay S (2003): Adipocytokines in synovial fluid. *Jama* 290, 1709-10

Schiff MH (2000): Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1, i103-8

Schminke B, Miosge N (2014): Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. *Curr Rheumatol Rep* 16, 461

Scotece M, Conde J, Gomez R, Lopez V, Lago F, Gomez-Reino JJ, Gualillo O (2011): Beyond fat mass: exploring the role of adipokines in rheumatic diseases. *ScientificWorldJournal* 11, 1932-47

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010): Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-108

Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, Tsezou A (2007): Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 872-83

Solomon G, Atkins A, Shahar R, Gertler A, Monsonego-Ornan E (2014): Effect of peripherally administered leptin antagonist on whole body metabolism and bone microarchitecture and biomechanical properties in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306, E14-27

Staikos C, Ververidis A, Drosos G, Manolopoulos VG, Verettas DA, Tavridou A (2013): The association of adipokine levels in plasma and synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1077-83

Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Koutedakis Y, Kitas GD (2011): Obesity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 50, 450-62

Stofkova A (2009): Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* 43, 157-68

Strobel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, Moldovan F, Barbero A, Martin I (2010): Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther* 12, R34

Tamer TM (2013): Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol* 6, 111-25

Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM (2007): Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 179, 5483-92

Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001): Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44, 585-94

Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM (2014): Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*,

Tong KM, Shieh DC, Chen CP, Tzeng CY, Wang SP, Huang KC, Chiu YC, Fong YC, Tang CH (2008): Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1,

PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 20, 1478-88

Toussiro E, Streit G, Wendling D (2007): The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr Med Chem* 14, 1095-100

Tsuchida AI, Beekhuizen M, MC TH, Radstake T, Dhert W, Saris D, van Osch G, Creemers LB (2014): Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 16, 441

van Vollenhoven RF (2009): Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 5, 531-41

Vermeij EA, Broeren MG, Bennink MB, Arntz OJ, Gjertsson I, P LEMvL, van den Berg WB, Koenders MI, van de Loo FA (2014): Disease-regulated local IL-10 gene therapy diminishes synovitis and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis*,

Villalvilla A, Gomez R, Largo R, Herrero-Beaumont G (2013): Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci* 14, 20793-808

Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Paivarinta U, Moilanen T, Moilanen E (2009): Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm* 2009, 345838

Wang Q, Cai J, Wang J, Xiong C, Yan L, Zhang Z, Fang Y, Zhao J (2014): Down-regulation of adiponectin receptors in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Biochem Biophys* 70, 491-7

Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X (2013): Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 1751-62

WHO (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894, i-xii, 1-253

Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. Bull World Health Organ 81, 646-56

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M (2003): Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 423, 762-9

Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Guilak F (2006): Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. Osteoarthritis Cartilage 14, 889-97

Yusuf E, Ioan-Facsinay A, Bijsterbosch J, Klein-Wieringa I, Kwekkeboom J, Slagboom PE, Huizinga TW, Kloppenburg M (2011): Association between leptin, adiponectin and resistin and long-term progression of hand osteoarthritis. Ann Rheum Dis 70, 1282-4

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-32

Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014): Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. Cell Stem Cell 15, 154-68

Zuo W, Wu ZH, Wu N, Duan YH, Wu JT, Wang H, Qiu GX (2011): Adiponectin receptor 1 mediates the difference in adiponectin-induced prostaglandin E2 production in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. Chin Med J (Engl) 124, 3919-24

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die außergewöhnlich gute Betreuung und die Unterstützung beim Entstehen dieser Arbeit. Durch sein Wirken entstand eine sehr familiäre Laboratmosphäre. Diese gab stets Raum für fachspezifische Diskussionen, ein kritisches Erörtern und ermutigende Worte. Die Anfertigung der Dissertation ermöglichte mir einen intensiven Einblick in den Laboralltag sowie in das wissenschaftliche Arbeiten einer Forschungsgruppe.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Christa Bode für ihre geduldige Einarbeitung und dafür, dass sie mir mit fachlicher Kompetenz und Erfahrung Tag für Tag zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke und Herrn Gökhan Cingöz, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und meine Arbeit durch ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Anregungen sehr unterstützten.

Hayat Muhammad danke ich für viele Stunden erklärender Worte, die mir insbesondere die ersten Wochen der Einarbeitungszeit sehr erleichterten.

Außerdem möchte ich meinen Mitdoktoranden einen großen Dank aussprechen. Während der zahlreichen Stunden, die wir im Labor verbrachten, schenkten sie mir viel Zeit für Erklärungen und unterstützten mich durch freundschaftliches Verständnis.

Insbesondere Frau Elke Henze danke ich für einen großartigen Zusammenhalt innerhalb der Forschungsgruppe sowie eine herzliche Arbeitsatmosphäre.

## Lebenslauf

Am 18. September 1988 kam ich als erstes Kind meiner Eltern Silje Johannsen und Rainer Johannsen, geborener Struck, in Leer, Ostfriesland zur Welt.

Vier Jahre später wurde mein Bruder geboren, der heute an der Universität zu Köln im sechsten Semester Medizin studiert. Meine Mutter ist Studienrätin, mein Vater ist Diplom-Bauingenieur und arbeitet als Oberstudienrat.

Im Sommer 1995 wurde ich eingeschult. Den größten Teil meiner Schulzeit verlebte ich in Leer. Zunächst besuchte ich die Daalerschule. Das fünfte und sechste Schuljahr verbrachte ich an der Möörkenschule und daraufhin wechselte ich zum Ubbo-Emmius-Gymnasium. Im Jahr 2005 lebte ich im Rahmen eines Schüleraustauschs vier Monate in Frankreich und besuchte dort das Lycée Blanche de Castille in Nantes. Drei Jahre später absolvierte ich am Ubbo-Emmius-Gymnasium mein Abitur.

Mit dem Sommersemester 2009 begann für mich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen, an der ich 2011 auch das Physikum ablegte. Vom September 2012 bis zum Juli 2013 verbrachte ich im Rahmen des ERASMUS-Programms zwei Semester in Italien und studierte dort im Norden des Landes an der Università degli Studi di Verona. Ein Semester nach meiner Rückkehr an die Georg-August Universität begann ich im März 2014 die experimentelle Forschung zu meiner Dissertation im Fach Humanmedizin in der Arbeitsgruppe orale Biologie und Gewebere-

generation der Abteilung Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge. Den schriftlichen Teil des zweiten Staatsexamens der Humanmedizin werde ich voraussichtlich im April 2015 absolvieren, bevor die mündliche Prüfung nach dem Praktischen Jahr zwischen Mai und Juni 2016 stattfinden wird.