

Diss. ETH NR. 10121

Regulation der Differenzierung von Chondrozyten
in vitro

Abhandlung

Zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

vorgelegt von

Kathrin Böhme

Dipl. Biochemiker MLU Halle
Geboren am 16. April 1963
in Halle (BRD)



Cat E

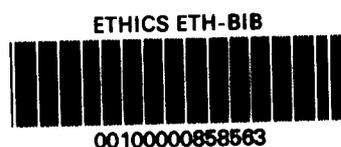
angenommen auf Antrag von :

Prof. Dr. K.H. Winterhalter, Referent

Prof. Dr. P. Bruckner,

Koreferent

1993



8. Zusammenfassung

Hyaliner Knorpel spielt als Gleitfläche an der Oberfläche von Gelenken und als vorübergehendes Gewebe in der Wachstumsfuge bei der Knochenentstehung und der Heilung von Knochenbrüchen eine Rolle. Auf den Gelenkoberflächen bleibt der Knorpel zeitlebens erhalten, und die Chondrozyten sind Ruhezellen mit niedriger metabolischer Aktivität.

Im Knorpel der Wachstumsfuge dagegen, der während des Wachstums durch Knochen ersetzt wird, entwickeln sich die Zellen weiter. Sie durchlaufen zuerst ein proliferatives und später ein hypertrophes Stadium, wodurch das Gewebe für die Knochenbildung vorbereitet wird.

Wie die unterschiedliche Differenzierung dieser zwei Knorpelgewebe reguliert wird, ist bis heute noch weitgehend unbekannt.

In dieser Dissertation wurde die Regulation der verschiedenen Differenzierungsstadien von Chondrozyten in Kultur untersucht.

Die sogenannte terminale Differenzierung der Chondrozyten wird durch diffundierbare Faktoren reguliert und ist durch Serum in vitro induzierbar. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Wachstumsfaktoren oder Hormone identifiziert, die in die Regulation der Differenzierung der gesamten Population von Knorpelzellen aus dem Brustbein 17 tägiger Hühnchenembryonen beteiligt sind.

Unter völlig serumfreien Bedingungen in Agarosesuspensionskultur konnten Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF I) oder Insulin das proliferative Stadium, d.h. den ersten Schritt in der Kaskade der terminalen Chondrozytendifferenzierung der Wachstumsfuge, hervorrufen. Neben der Proliferation wurde unter der Wirkung der genannten Faktoren in vitro eine erhöhte Synthese der Proteoglykane und der knorpelspezifischen Kollagen II, IX und XI ohne Induktion der Hypertrophie gefunden. In der Gegenwart von Thyroidhormonen in der Kultur wurden die Zellen, die als Gemisch unabhängig von ihrer Position im Sternum kultiviert wurden, hypertroph und begannen, Kollagen X und alkalische Phosphatase ohne vorhergehende Proliferation zu synthetisieren.

Die Zugabe von TGF β 2 zum Kulturmedium verursachte dagegen eine Dedifferenzierung der Knorpelzellen des Sternums. Die Zellen begannen Kollagen I zu synthetisieren und ähnelten damit dem dedifferenzierten Phänotyp von in Monolayer kultivierten Chondrozyten. Zusätzlich wurde die Induktion der terminalen Differenzierung der Chondrozyten durch TGF β 2 gehemmt, was darauf hinweist, dass TGF β 2 die Effekte anderer Faktoren auf die Zellen als negativer Regulator beeinflussen kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des sternalen Ursprungsortes der Zellen auf die Wirkungen der oben beschriebenen einzelnen Faktoren untersucht. Die Zellen des kranialen Teils des Brustbeins sind mit Ausnahme der äusseren Spitzen schon weiter in Richtung Hypertrophie differenziert, während die Zellen des kaudalen Teils eher Ruhechondrozyten ähneln. Hier zeigte sich, dass alle anabolen Signale (IGF I, Insulin, Thyroidhormone, FBS) in den kranialen Zellen die Hypertrophie verstärken können. Da mit keinem der hier aufgeführten Faktoren die Hypertrophie in den kaudalen Zellen induziert werden konnte, folgern wir, dass diese anabolen Signale die Weiterdifferenzierung der Chondrozyten fördern aber nicht einleiten können. Dagegen bekamen wir Hinweise, dass vor allem die kaudalen Zellen Faktoren synthetisieren, die ihre eigene terminale Differenzierung und auch die der kranialen Zellen unterdrücken können. Als in Frage kommende Hemmstoffe der Differenzierung wurden bFGF und TGF β 2 gefunden. Diese beiden Faktoren hemmen die durch IGF I stimulierte Hypertrophie in den kranialen Zellen, wenn sie gleichzeitig ins Medium gegeben werden. Ein Faktor allein konnte nur eine zeitliche Verzögerung der Hypertrophie (Kollagen X und alkalische Phosphatase) hervorrufen.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass der Prozess der terminalen Chondrozytendifferenzierung schon in den Zellen vorprogrammiert ist, aber durch lokale autokrine Faktoren je nach Position und Entwicklungsstadium der Knorpelzelle (ob im Gelenk oder in der Wachstumsfuge) unterdrückt wird.

9. Summary

Hyaline Cartilage serves as a gliding surface of joints (articular cartilage) and as an intermediary tissue (growth plate cartilage) in bone formation or fracture healing processes. The articular cartilage fulfills a permanent function within the skeleton and its cells remain resting chondrocytes with low metabolic activities.

In contrast, the growth plate cartilage is replaced by bone. The chondrocytes of the growth plate undergo terminal differentiation. Initially, they proliferate and, later, they became hypertrophic in that they increase their size and additionally produce collagen X and alkaline phosphatase. The mature cells prepare the tissue for ossification. It is still unclear how the differentiation of these two types of cartilage is regulated.

The terminal chondrocyte differentiation is modulated by diffusible factors and can be induced by serum in culture.

In this thesis we examined the regulation of differentiation of sternal chondrocytes from 17 days old chicken embryos in serum-free agarose suspension culture. In the first part we have studied the influence of growth factors and hormones of the maturation of chondrocytes derived from the whole sternum. Under strictly serum-free conditions IGF I and Insulin triggered the first steps of chondrocyte maturation, i.e. cell proliferation and increased synthesis of proteoglycans and cartilage specific collagens II, IX and XI without progression to hypertrophy.

Under the direction of thyroid hormones, cells did not proliferate but became typical hypertrophic chondrocytes, extensively producing collagen X and alkaline phosphatase. The addition of TGF β 2 to the culture media caused cells to acquire a phenotype resembling chondrocytes dedifferentiated in monolayer culture. The factor arrested cartilage collagen synthesis and promoted a switch to type I collagen production. In addition TGF β 2 inhibited the induction of terminal chondrocyte differentiation by serum or thyroid hormones suggesting that TGF β 2 finely tunes the effects of other growth factors onto the cells.

In the second part of this work we studied the effects of factors described above depending on the cellular origin from chondrocytes in the sternum. Chondrocytes derived from the inner cranial part of the sternum are further differentiated towards hypertrophy. But the cells derived from the caudal part resemble more resting chondrocytes. Anabolic signals (IGF I, Insulin, thyroid hormones and serum) further promoted hypertrophy in cranial cells but could not initiate the terminal differentiation in caudal cells. We concluded that caudal cells produce factors acting as inhibitors of chondrocyte maturation. As suitable factors responsible for the inhibition we could

identify TGF β 2 and bFGF. Both factors prevented hypertrophy stimulated by IGF I in cranial cells when given simultaneously. One factor alone only induced a delay in chondrocyte maturation.

These results lead to the hypothesis that the process of terminal chondrocyte differentiation is already induced in the cells but is inhibited by local autocrine factors depending on the position and the stage of development of the chondrocytes (in the growth plate or the joint).