

Haben Kalzium- und Zinkionen einen Einfluß auf die Matrixmolekülsynthese von Chondrozyten?

J. Flechtenmacher¹, Y. Koyano⁴, M. Hejna³, T. M. Schmid², W. Puhl¹,
J. Mollenhauer²

¹Orthopädische Klinik im Rehabilitationskrankenhaus Ulm, Orthopädische Klinik der Universität Ulm

²Dept. of Biochemistry, Rush Medical College, WHO Referenzzentrum für Osteoarthritis (Rheumatologie), Chicago, IL, USA

³Dept. of Orthopaedic Surgery, Rush Medical College, Chicago, IL, USA

⁴Orthopaedic Surgery, Jikei University Medical School, Tokyo, Japan

Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war die *in vitro* Charakterisierung des Effektes verschiedener Kalzium- (Ca) und Zink- (Zn) Konzentrationen auf die Matrixmolekülsynthese und Zellteilung fötaler und adulter boviner Chondrozyten. Unter Kalziumkonzentrationen <0,2 mM sowie unter Zinkkonzentrationen von 0,1–50 µM kam es im Vergleich zu Standardbedingungen zu einer Erhöhung der Kollagensynthese. Die Proteoglykansynthese und die Proliferationsrate der fötalen und adulten Chondrozyten wurden durch diese Behandlung nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu induzierten hohe Kalziumkonzentrationen (10 mM) die Expression von Typ X Kollagen in Wachstumsfugenchondrozyten. Die Ergebnisse werden in der Diskussion mit Kalziumkanal-konfigurationen in Verbindung gebracht.

Schlüsselwörter: Kalziumionen – Zinkionen – Gelenkknorpel – Wachstumsplatte

Do Calcium and Zinc Ions Influence the Matrix Molecule Synthesis of Chondrocytes?

The experiments described here tested the effect of various calcium (Ca) and Zinc (Zn) concentrations on cell proliferation and matrix molecule synthesis of fetal and adult bovine chondrocytes in monolayer cultures. Levels of Ca <0.2 mM in a culture medium or the addition of Zn (0.1–50 µM) selectively promoted the production of collagen but did not affect significantly synthesis of proteoglycans. No change in proliferation of fetal and adult chondrocytes could be observed. In contrast 10 mM Ca promoted the hypertrophic differentiation of chondrocytes (e.g. expression of collagen type X). The results are related to calcium channel configurations in chondrocytes in the discussion.

Key words: calcium ions – zinc ions – articular cartilage – growth plate – collagen

Einleitung

Der Kalziummetabolismus in Chondrozyten nimmt eine Schlüsselstellung bei der Differenzierung der Chondrozyten während der embryonalen und fötalen enchondralen Ossifikation ein (1, 2). Matrixvesikel, welche von postmitotischen hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge sezerniert werden, dienen als Kristallisationspunkte für Hydroxyapatitkristalle und bilden ein Substrat für die Knochenbildung in der Wachstumsfuge (3, 4). Unter bestimmten, bisher nicht geklärten, pathophysiologischen Bedingungen, z.B. beim Krankheitsbild „Arthrose“, kommt es jedoch auch im adulten artikulären Knorpel zu sekundären Ossifikationszentren (5, 6). Zudem werden Zusammenhänge zwischen der Ablagerung von Kalziumkristallen in der Knorpelmatrix, wie sie als klinisches Bild der Chondrokalzinose imponieren, und „Arthrose“ vermutet und als pathologisch modifizierter Kalziumstoffwechsel interpretiert (7).

Der fötale Kalziummetabolismus wie auch der Metabolismus unter pathophysiologischen Bedingungen sind abhängig von der Verfügbarkeit hoher extrazellulärer Kalzium- und Phosphatkonzentrationen (4, 8) oder der Akkumulation hoher Kalziumkonzentrationen in zellulären Organellen wie Mitochondrien, dem glatten endoplasmatischen Retikulum oder Matrixvesikeln (9, 10). Es gibt zudem Hinweise aus *in vitro* Untersuchungen, daß hohe Kalziumkonzentrationen die hypertrophe Differenzierung in fötalen Hühnerchondrozyten anregen (8). Die gleiche hypertrophe Differenzierung, die sich unter anderem als Expression von Typ X Kollagen darstellt, wird als einer der frühen Differenzierungsschritte bei der Knorpeldegradation in humanem Gelenkknorpel bei dem Krankheitsbild „Arthrose“ angesehen (11).

Andere Zelltypen bevorzugen niedrige Kalziumkonzentrationen um bestimmte Funktionen und Phänotypen beizubehalten (12, 27).

Zink, ebenfalls als zweifach positiv geladenes Ion in Lösung, wird ebenfalls mit der Differenzierung von Knorpel und Knochengewebe in Verbindung gebracht. Zinkmangel in der Nahrung von Kindern führt zu einer Wachstumsretardierung (13, 14). Wird Zink in der Nahrung substituiert, führt dieses im Serum zu einer Erhöhung von Phosphat, Kalzium und einem für Knor-

pel- und Knochenwachstum wichtigen Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor 1, IGF-1) (14). In vitro Untersuchungen mit Zell- und Gewebekultur deuten auf einen direkten Einfluß von Zinkionen auf den Chondrozyten-metabolismus hin (15, 16).

Auf Grund der Kenntnis, daß hohe und niedrige Kalziumkonzentrationen verschiedene Differenzierungsschritte im Chondrozyten in der Embryo- und Fötogenese wie auch unter pathophysiologischen Bedingungen beeinflussen, ist vorgeschlagen worden, daß Kalzium und Zink als Regulatoren der Matrixmolekülsynthese dienen. Als Mechanismus könnte eine differenzielle Bindung von Matrixmolekülen an Rezeptoren auf Chondrozyten (17, 18) und/oder auch die Beeinflussung von Kalziumkanälen auf Chondrozyten wirksam werden (4).

Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war die *in vitro* Charakterisierung des Effektes verschiedener Kalzium- und Zinkkonzentrationen auf die Matrixmolekülsynthese und Zellteilung fötaler boviner Chondrozyten aus Gelenkknorpel und Wachstumsfugen, und adulter boviner Chondrozyten aus Gelenkknorpel um die bisher beschriebenen Beobachtungen auf zellulärem und molekularem Gebiet zu klären.

Material und Methode

Isolation der Zellen: Bovine Föten (2. Trimester) und Metacarpalgelenke der Vorderbeine ausgewachsener Jungtiere (18 Monate alt) wurden von einem Schlachthof erhalten. Der Gelenkknorpel großer Gelenke (Schulter, Kniegelenk und Hüftgelenk) und der Wachstumsfugenknorpel (hypertrophe und proliferative Zone) von Föten sowie der gesamte Gelenkknorpel (gesamte Dicke) der adulten Metacarpalgelenke wurde unter sterilen Bedingungen entnommen. Chondrozyten wurden durch sequentielle enzymatische Verdauung mit Pronase (10000 U/ml, Sigma) und Kollagenase (1500 U/ml, Böhringer Mannheim) isoliert (19). Als Kontrollgruppe wurden bovine Lungenfibroblasten durch enzymatische Verdauung fötaler boviner Lungen mit Kollagenase isoliert und nach zweimaliger Passage verwendet.

Zellkultur und Zellproliferation: Als Zellsystem kam das Monolayersystem mit einer hohen Zelldichte zur Anwendung. Nach enzymatischer Isolierung wurden die Chondrozyten in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ in Kulturschalen (Falcon) ausgesät und unter den nachfolgend angegebenen Kulturbedingungen bis zu 12 Tagen in 99% Luftfeuchtigkeit, 5% CO_2 und 37° Celsius gehalten. Das Medium wurde täglich gewechselt. Der DNA-Gehalt pro Kulturschale wurde über Fluoreszenz wie folgt bestimmt und damit die Zellzahl/Kulturschale berechnet (20). Die Zellen wurden mit 0.25% Trypsin bei 37°C für 10 min. verdaut, dann wurde die Zellsuspension bei $1000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurde das verbliebene Zentrifugat mit Papain (10 mg/ml in PBS) bei 60°C für 12 h verdaut. Der Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) wurde danach dazugegeben und die Fluoreszenz

der Mixtur in einem Fluorometer (Turner; Exzitation 365 nm, Emission 460 nm) gemessen. Kälberthymus-DNA diente als Standard.

Metabolische Markierung und Analyse der markierten Matrixmoleküle: Als Medium vor Beginn der experimentellen Bedingungen wurde DMEM/F12 (1:1) Medium verwendet. Dieses wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) substituiert. Die Kalziumkonzentration des verwendeten FKS war 141 mg/l. Der initiale pH aller Kulturen wurde auf 7.0 eingestellt. Die Zellen wurden in hoher Dichte kultiviert um deren phänotypische Stabilität zu gewährleisten ($2 \times 10^6/\text{cm}^2$ in 24-Platten, Falcon) (21). Die Zellen wurden unter den oben genannten Bedingungen für 48 Stunden kultiviert bevor die metabolische Markierung durchgeführt wurde. Während der metabolischen Markierung wurde DMEM ohne Serumsupplementierung verwendet, um die spezifische Aktivität der markierten Proteine zu maximieren und die Ionenkonzentration im Medium konstant zu halten. Die Zellen wurden für 16 h mit 20 μCi [^3H]Proline und 5 μCi [^{35}S]Sulfate/ml (Amersham) in 0,5 ml DMEM in der Anwesenheit definierter Zink- und Kalziumkonzentrationen wie im Ergebnisteil dargestellt markiert. Es kam eine Kalzium-freie DMEM Mixtur (Gibco) ($<0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$) zur Anwendung, die jeweils mit definierten Zink- und Kalziumkonzentrationen eingestellt wurde. Diese Medien wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure (Vitamin C) und 50 $\mu\text{g/ml}$ β -Amino-Propionitril (βAPN) (als Kollagen-Quervernetzung Inhibitor) substituiert.

Zink und Kalzium wurden aus einer frisch hergestellten und steril filtrierten 10 mM ZnCl_2 oder CaCl_2 in 10 mM HCl Lösung zugegeben, um die Ausfällung in dem mit Bikarbonat gepufferten Kulturmedium zu verhindern. Nach Inkubation wurden die Makromoleküle mit 4 M Guanidinium/HCl extrahiert und die nicht inkorporierte Radioaktivität mittels PD-10 Säulenchromatographie oder Präzipitation mit 10% Trichloressigsäure abgetrennt. Der Kollagengehalt wurde über die Analyse des Hydroxyprolinegehaltes mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (22). Die Kollagentypenanalysen erfolgten nach limitierter Pepsinverdauung (50 $\mu\text{g/ml}$ Pepsin (2500 U/mg) in 0.1 M Essigsäure) mittels SDS Gelelektrophorese (23, 24).

Ergebnisse

Morphologie und Zellteilung

Die Experimente wurden mit Monolayerzellkulturen hoher Zelldichte durchgeführt, um eine Stabilisierung des knorpelspezifischen Phänotypes zu gewährleisten (21), die Isolation vom Kollagenen zu erleichtern und um technische Probleme, wie sie bei dreidimensionalen Zellkulturen auftreten (Separation der Matrixproteine vom Trägergel Alginate oder Agarose) zu vermeiden (25). Die Zellen behielten unter diesen Kulturbedingungen sowohl über kurze (72 h) wie auch längere Zeit (14 Tage) die Fähigkeit knorpelspezifische Kollagene zu synthetisieren und auch die morphologischen Charakteristika von Chondrozyten (Abb. 1). Änderungen der Kalzium- oder Zinkkonzentration hatten nur wenig Effekt auf die Morphologie der Zellen (Abb.

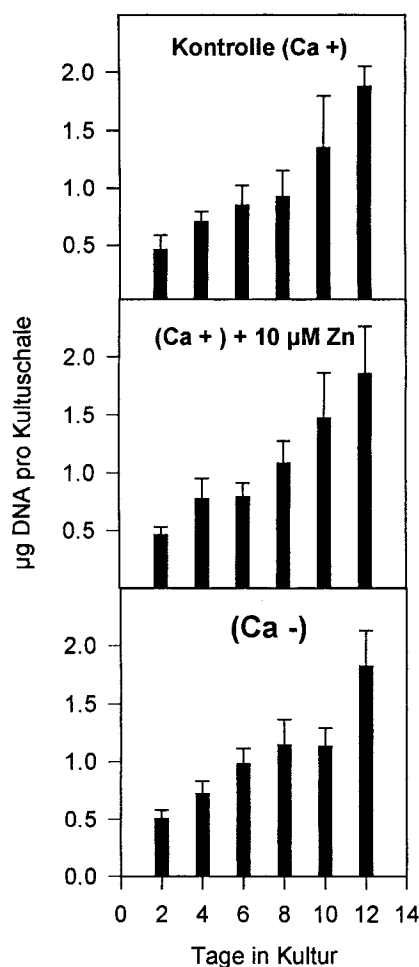


Abb. 2 Proliferationskinetik von fötalen artikulären Chondrozyten. 2×10^5 Zellen sind in 6 cm Kulturschalen ausgesät worden. Die Proliferationsaktivität wurde über den DNA Gehalt der Kulturschale berechnet ($n=8$)

signifikant veränderte, auch nicht durch unterschiedliche Zinkkonzentrationen. Fötale Chondrozyten waren am sensitivsten, wenn die Kalziumkonzentration geändert wurde (Tabelle 1). Lungenfibroblasten zeigten keinen Effekt bei Veränderungen der Kalzium- oder Zinkkonzentration (Tabelle 1).

Die Wirkung war dosisabhängig. Die niedrigste Kollagensynthese zeigte sich bei Standardmedium mit einer Kalziumkonzentration von 1,8 mM CaCl_2 (Abb. 3). Eine deutliche Erhöhung der Kollagensynthese konnte in der Gegenwart deutlich niedrigerer Kalziumkonzentrationen bei fötalen und adulten Chondrozyten nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Kalziumkonzentrationen auf 10 mM führte bei den adulten Chondrozyten zu einer leichten Erhöhung der Kollagensynthese.

Die Zugabe von Zink zu Kalzium-haltigem Medium bewirkte eine dosisabhängige Veränderung in der Kollagensynthese ähnlich der mit Kalzium gesehenen. Die maximale Wirkung zeigte sich bei 10 µM Zink (Abb. 4), und führte zu einer 3- bis 5fachen Synthesesteigerung. Die Zugabe von Zink zu kalziumfreiem Medium führte zu keiner zusätzlichen Veränderung der Kollagen- oder Proteoglykansynthese (Abb. 4). Adulte Chondrozyten reagierten bei einer höheren Konzentration als fötale Chondrozyten (50 µM Zn^{2+} im Vergleich zu 10 µM) (Tabelle 1).

Kollagentypisierung

Sowohl bei fötalen artikulären wie auch bei adulten artikulären Chondrozyten wurde die Art der synthetisierten Kollagene durch unterschiedliche Kalzium- oder Zinkkonzentrationen nicht verändert. Die Zellen synthetisierten überwiegend Typ II Kollagen mit einem kleinen Anteil Typ XI Kollagen (Daten nicht gezeigt). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch bei Chondrozyten aus der Wachstumsfuge. Während Typ X Kollagen unter niedrigen Kalziumkonzentrationen sich kaum nachweisen ließ, wurde die Synthese dieses Moleküls durch höhere Kalziumkonzentrationen deutlich gesteigert (Abb. 5).

gemessen wurde. Vergleichende Messungen des Hydroxyprolinegehaltes unter den verschiedenen Kulturbedingungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie zeigten keine Veränderungen des Verhältnisses Prolin/Hydroxyprolin unter den verschiedenen Ionenkonzentrationen. Daher sind nur die Prolindaten dargestellt. Der Prolineinbau, respektive die Kollagensynthese, wurde durch niedrige Kalziumkonzentrationen stimuliert während die Proteoglykansynthese sich hierdurch nicht

Tab. 1

Zelltyp	Ca ²⁺ + Konzentration 0,1 mM		Ca ²⁺ + Konzentration 2 mM Zn ²⁺ + Konzentration 10 µM ⁺		Ca ²⁺ + Konzentration 0,1 mM Zn ²⁺ + Konzentration 10 µM ⁺	
	PRO	SO ₄	PRO	SO ₄	PRO	SO ₄
Adult Gelenk	152*	128 ns	125 ns (Zn ²⁺ + 50 µM)	111 ns	169* (Zn ²⁺ + 50 µM)	111 ns
Fötal Gelenk	359*	72 ns	252*	97 ns	365*	83 ns
Fötal Wachstumsfuge	240*	112 ns	115 ns	94 ns	245*	106 ns
Fibroblast	125 ns	89 ns	108 ns	114 ns	149*	108 ns

Übersicht zum [³H]Prolin- [Pro] und [³⁵S]Sulfat- [SO₄] Einbau in Makromoleküle in Prozent zur Kontrolle mit 1,8 mM CaCl_2 . Die Daten entstammen aus Experimenten jeweils 3 unabhängigen Gruppen ($n=3$; * = $p < 0.05$; ns = nicht signifikant. ⁺ Bei adulten Chondrozyten sind die Werte für 50 µM Zink angegeben, die Werte für 10 µM waren nicht signifikant. Einzelheiten zur Statistik der Experimente (Standardabweichung, Vertrauensbereiche) sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

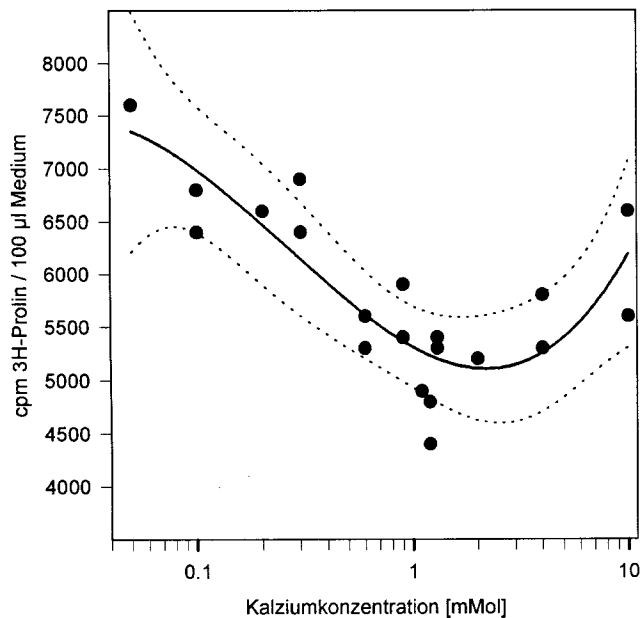


Abb. 3 Dosis-Wirkungsexperiment mit adulten artikulären Chondrozyten. Die Daten zeigen die Kollagenproduktion (Prolineinbau) abhängig von der Kalziumkonzentration. Die Graphik zeigt die Regression [$f(x) = x^3$] (durchgezogene Linie) mit dem 99% Konfidenzintervall (unterbrochene Linie)

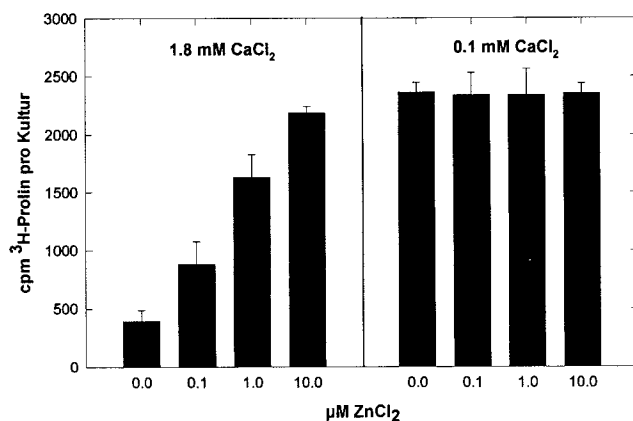


Abb. 4 Dosis-Wirkungsexperimente für fötale artikuläre Chondrozyten. Die Daten zeigen die Kollagenproduktion (Prolineinbau) abhängig von der Zinkkonzentration in der Anwesenheit von einer Standard-Kalziumkonzentration (2 mM) und einer erniedrigten Kalziumkonzentration (0.1 mM) ($n = 4$)

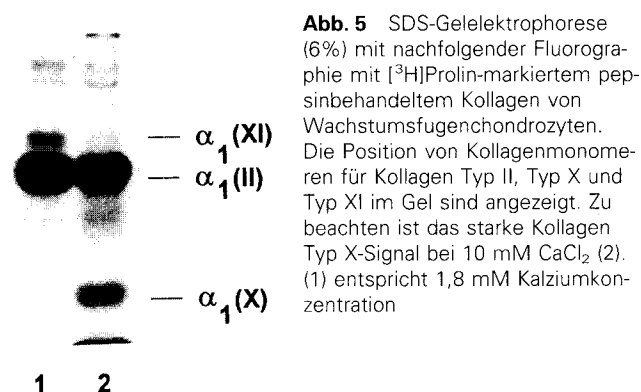


Abb. 5 SDS-Gelelektrophorese (6%) mit nachfolgender Fluorographie mit [^3H]Prolin-markiertem pepsinbehandeltem Kollagen von Wachstumsfugenchondrozyten. Die Position von Kollagenmonomeren für Kollagen Typ II, Typ X und Typ XI im Gel sind angezeigt. Zu beachten ist das starke Kollagen Typ X-Signal bei 10 mM CaCl_2 (2). (1) entspricht 1,8 mM Kalziumkonzentration

Diskussion

Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war die *in vitro* Charakterisierung des Effektes verschiedener Kalzium- und Zinkkonzentrationen auf die Matrixmolekülsynthese und Zellteilung fötaler und adulter Chondrozyten um die bisher beschriebenen Beobachtungen – nämlich der Einfluß dieser divalenten Ionen auf Differenzierungsschritte im Chondrozytenmetabolismus – auf zellulärem und molekularem Gebiet zu klären. Als Modellsystem wurde das bovine System gewählt weil es sich hierbei um ein Säugetier handelt und bisherige Untersuchungen (19) auf die Vergleichbarkeit zwischen humanen und bovinen Knorpel hindeuten. Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das humane System sollte trotzdem nur unter Vorbehalt erfolgen. Entsprechende Experimente mit humanem Material sind jedoch, vor allem da bei Knorpelzellkulturen nur Primärkulturen möglich sind, aus ethischen Gründen nur eingeschränkt durchführbar.

Als Zellsystem kam das Monolayersystem mit hoher Zelldichte zur Anwendung, da gezeigt worden ist, daß mit diesem System der chondrozytische Phänotyp *in vitro* erhalten bleibt (21). Zudem erleichtert dieses Zellsystem die Isolation von Kollagenen und man vermeidet Probleme bei der Extraktion der Matrixproteine wie sie bei dreidimensionalen Zellkulturen in Agarose- und Alginatgel auftreten (letzteres benötigt auch die Anwesenheit von Kalzium) (25).

Unter einer erniedrigten Kalziumkonzentration kam es im Vergleich zu Standardbedingungen zu einer Erhöhung der Kollagensynthese zwischen 25 und 350%. Fötale artikuläre Zellen reagierten am stärksten. Unter den gleichen Bedingungen kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Proteoglykansynthese. Ähnliche Effekte bei fötalen Zellen konnten beobachtet werden, wenn niedrige Zinkkonzentrationen (10 μM) dem Kalzium enthaltenden Medium zugegeben wurden, adulte Chondrozyten benötigen eine höhere Zinkkonzentration (50 μM). Interessanterweise reagierten die fötalen Fibroblasten auf Veränderungen der Zink- und Kalziumkonzentrationen nicht: Dieses könnte auf einen für Chondrozyten spezifischen Mechanismus hindeuten.

Sowohl bei fötalen wie auch bei adulten artikulären Chondrozyten kam es zu keiner Beeinflussung der Expression unterschiedlicher Kollagene. Die Zellen synthetisierten mehrheitlich das knorpelspezifische Typ II Kollagen und auch, wie für Knorpel typisch, konnte etwas Typ XI Kollagen nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch bei Chondrozyten aus der Wachstumsfuge. Während Typ X Kollagen unter niedrigen Kalziumkonzentrationen kaum nachweisbar war, wurde die Synthese dieses Moleküls durch höhere Kalziumkonzentrationen deutlich gesteigert. Ähnliche Ergebnisse sind bisher lediglich für embryonale Hühnerchondrozyten beschrieben worden (8), für Chondrozyten aus Säugetieren stand der Nachweis eines direkten Einflusses von Kalzium auf die Kollagen Typ X Produktion aus.

Eine erhöhte Verfügbarkeit von Kalzium kann somit, eventuell auch zusammen mit Vitamin D Derivaten (26), bei Chondrozyten Differenzierungs-

schritte zum hypertrophen Chondrozyten einleiten. Eine Reduktion des angebotenen Kalziums andererseits, müßte die Differenzierung zum hypertrophen Chondrozyten verlangsamen oder sogar aufheben. Ähnliche Beobachtungen sind für Keratinozyten gemacht worden. Während niedrige Kalziumkonzentrationen den proliferativen Phänotyp induzierten wurde durch höhere Kalziumkonzentrationen eine terminale Differenzierung (Stratifizierung) eingeleitet (27).

Obwohl es einige Hinweise in der Literatur über den Effekt niedriger Kalziumkonzentrationen auf den Chondrozytenmetabolismus gibt, sind diese nicht eindeutig und die Interpretation der Ergebnisse sind jeweils mit anderen Faktoren in Zusammenhang gebracht worden (28, 29, 30, 31). Es ist deswegen in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten versucht worden, Chondrozyten unterschiedlicher Differenzierungsstufen (Gelenkknorpel/Wachstumsfuge) sowie unterschiedlicher Reifungsstadien (fötal/adult) unter standardisierten Bedingungen zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen, daß eine Unterscheidung der Chondrozytenpopulationen notwendig ist und daß für Chondrozyten und somit auch Knorpel als Organ insgesamt generalisierte Aussagen vermieden werden sollten.

Die bisher beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen des Effektes niedriger Konzentrationen von Zink deuten auf eine Stimulation der Knorpel- und Knochenmatrixsynthese hin (15, 16, 14, 32, 33). Die Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente bestätigen diese Beobachtungen. Die Zinkkonzentrationen, wie sie in diesen Experimenten, wie auch die in den zitierten Publikationen, Anwendung fand, liegen in einem Bereich, welche bei elektrophysiologischen Experimenten zur Blockierung spannungsabhängiger Kalzium/Kalium-Kanäle verwendet werden. Sie finden auch Anwendung in der „patch clamp“ Analyse (Messung von Ionenströmen durch Mikroelektroden an einzelnen Zellen) bei Chondrozyten (8). Während bei Chondrozyten die Funktion solcher Ionenkanäle bisher nicht genau untersucht ist, gibt es bei Keratinozyten Hinweise, daß solche Kanäle bei der Cytodifferenzierung eine wichtige Rolle spielen (34, 35). Obwohl bisher keine direkten Daten vorliegen, sollte in Erwägung gezogen werden, daß solchen Ionenkanälen bei der Regulation der Kollagenbiosynthese eine Rolle zukommen kann, vor allem insbesondere dann, wenn diese Kanäle mit den schon beschriebenen Kollagenrezeptoren auf dem Chondrozyten welche als Mechanorezeptoren fungieren können, interagieren (36, 37, 38, 39). Die Blockierbarkeit der Kalzi- umwirkung durch den Kalziumkanalantagonist Zink läßt eine Beeinflussbarkeit des Chondrozytenmetabolismus durch Kalziumkanalblocker und/oder elektrophysikalischer Maßnahmen möglich erscheinen. Weitere Arbeiten sind jedoch notwendig um den Effekt bisher bekannter sowie eventuell noch zu entwickelnder Kalziumkanalblocker und/oder elektrophysikalischer Maßnahmen zu beschreiben.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Lawrence Madsen und Lawrence Luchene für die technische Hilfe. Die Arbeit wurde ermöglicht durch den NIH grant 2-

P50-AR39239 sowie durch Unterstützung der Firma Opferrmann AG. Die Arbeiten wurden am Dept. für Biochemie, Rush Medical College, WHO Referenzzentrum für Osteoarthritis (Rheumatologie), Chicago, IL, USA (Dir.: Prof. Dr. rer. nat. K. E. Kuettner) durchgeführt.

Literatur

- ¹ Stocum, D. L., R. M. Davis, M. Leger, H. E. Conrad: Development of tibiotarsus in the chick embryo: biosynthetic activities of histologically distinct regions. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 54 (1979) 155–170
- ² Alini, M., Y. Matsui, G. R. Dodge, A. R. Poole: The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in the composition and degradation of type II collagen. *Calcif. Tissue Int.* 50 (1992) 327–335
- ³ Wuthier, R. E.: Matrix vesicles: formation and function – mechanisms in membrane/matrix – mediated mineralization. In: *Chemistry and biology of mineralized tissues* (ed. H. Slavkin and P. Price) (1992), pp. 143–152. Elsevier Science Publishers B. V.
- ⁴ Derfus, B. A., J. W. Rachow, N. S. Mandel, A. L. Boskey, M. Buday, V. M. Kushnaryov, L. M. Ryan: Articular cartilage vesicles generate calcium pyrophosphate dihydrate-like crystals *in vitro*. *Arthritis Rheumatism* 35 (1992) 231–240
- ⁵ Oegama, T. R., R. C. Thompson: Cartilage-bone interface (tidemark). In: *Cartilage changes in osteoarthritis* (ed. K. Brandt), pp. 43–52. Indianapolis: Indiana School of Medicine Publishers (1990)
- ⁶ Hulth, A.: Does osteoarthritis depend on growth of the mineralized layer of cartilage? *Clinical Orthopaedics* 287 (1991) 19–24
- ⁷ Swan, A. J., B. R. Heywood, P. A. Dieppe: Extraction of calcium containing crystals from synovial fluids and articular cartilage. *J. Rheumatol.* 19 (1992) 1764–1773
- ⁸ Bonen, D. K., T. M. Schmid: Elevated extracellular calcium concentrations induce type X collagen synthesis in chondrocyte cultures. *J. Cell. Biol.* 115 (1991) 1171–1178
- ⁹ Hargest, T. E., C. V. Gay, H. Schraer, A. J. Wasserman: Vertical distribution of elements in cells and matrix of epiphyseal growth plate cartilage determined by quantitative electron probe analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 275–286
- ¹⁰ Appleton, J., R. Lyon, K. J. Swindin, J. Chesters: Ultrastructure and energy-dispersive X-ray microanalysis of cartilage after rapid freezing, low temperature freeze drying, and embedding in Spurr's resin. *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 1073–1079
- ¹¹ von der Mark, K., T. Kirsch, A. Nerlich, A. Kuss, G. Weseloh, K. Glücker, H. Stöck: Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatism* 35 (1992) 806–810
- ¹² Brown, E. M.: Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol. Rev.* 71 (1991) 371–411
- ¹³ Chakar, A., R. Mokni, P. A. Walravens, P. Chappuis, F. Bleiberg-Daniel, J.-L. Mahu, D. Lemonnier: Plasma zinc and copper in Paris area preschool children with growth impairment. *Biol. Trace Element Res.* 38 (1993) 97–106
- ¹⁴ Nakamura, T., S. Nishiyama, Y. Futagoishi-Suginohara, I. Matsuda, A. Higashi: Mild to moderate zinc deficiency in short children: effect of zinc supplementation on linear growth velocity. *J. Pediatr.* 123 (1993) 65–69
- ¹⁵ Kirkpatrick, C. J., W. Mohr, O. Haferkamp: Influence of zinc and copper on lapine articular chondrocytes in monolayer culture. *Expl. Cell Biol.* 50 (1982) 108–114
- ¹⁶ Rest, J. R.: The histological effects of copper and zinc on chick embryo skeletal tissues in organ culture. *Br. J. Nutr.* 36 (1976) 243–253
- ¹⁷ Woods, V. L., Jr., P. J. Schreck, D. S. Gesink, H. O. Pacheco, D. Amiel, W. H. Akeson, M. Lotz: Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 37 (1994) 537–544
- ¹⁸ Dürr, J., S. Goodman, A. Potocnik, H. von der Mark, K. von der Mark: Localization of $\beta 1$ -integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 207 (1994) 235–244
- ¹⁹ Häuselmann, H. J., M. B. Aydelotte, B. L. Schumacher, K. E. Kuettner, S. H. Gütelis, E. J. M. A. Thonar: Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* 12 (1992) 116–129
- ²⁰ Kim, Y.-J., R. L. Y. Sah, J.-Y. H. Doong, A. J. Grodzinsky: Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal. Biochem.* 174 (1988) 168–176
- ²¹ Daniel, J. C., B. U. Pauli, Kuettner: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. III. effects of ascorbate. *J. Cell Biol.* 99 (1984) 1960–1969

- ²² Bienkowski, R. S., M. J. Cowan, J. A. McDonald, R. G. Crystal: Degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 4356–4363
- ²³ Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680–685
- ²⁴ Bonner, W. M., R. A. Laskey: Film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Europ. J. Biochem.* 46 (1974) 83–88
- ²⁵ Häuselmann, H., B. L. Schumacher, D. H. Pearl, E. J.-M. A. Thonar, K. E. Kuettner, M. B. Aydelotte: Gene expression and extracellular matrix ultrastructure of a mineralizing chondrocyte cell culture system. *Orthop. Res. Soc. Trans.* 16 (1991) 306
- ²⁶ Langston, G. G., L. D. Swain, Z. Schwartz, F. Del Toro, R. Gomez, B. D. Boyan: Effect of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on calcium ion fluxes in costochondral chondrocyte cultures. *Calcif. Tissue Int.* 47 (1990) 230–236
- ²⁷ Hodivala, K. J., F. Watt: Calcium-induced stratification of human keratinocytes: evidence of integrin-cadherin interactions. *J. Cell Biochem. Sup* 17E (1993) 168
- ²⁸ Deshmukh, K., W. G. Kline, B. D. Sawyer: Effects of calcitonin and parathyroid hormone on the metabolism of chondrocytes in culture. *Biochim. Biophys. A* 499 (1977) 28–35
- ²⁹ Deshmukh, K., B. D. Sawyer: Synthesis of collagen by chondrocytes in suspension culture: modulation by calcium, 3':5'-cyclic AMP, and prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1970) 3864–3868
- ³⁰ Norby, D. P., C. J. Malesud, L. Sokoloff: Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture. *Arthritis Rheum.* 20 (1977) 709–716
- ³¹ Benya, P. D., J. D. Shaffer: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30 (1982) 215–224
- ³² Ganan, Y., D. Macias, V. Garcia-Martinez, J. M. Hurler: In vivo experimental induction of interdigital tissue chondrogenesis in the avian limb bud results in the formation of extradigits. Effects of local microinjection of staurosporine, zinc chloride and growth factors. In: *Limb development and regeneration* (1993), pp. 127–139, Wiley-Liss, Inc.
- ³³ Shimokawa, N., M. Yamaguchi: Characterization of bone protein components with polyacrylamide gel electrophoresis: effects of zinc and hormones in tissue culture. *Mol. Cell. Biochem.* 177 (1992) 153–158
- ³⁴ Mauro, T. M., R. R. Isseroff, R. Lasarow, P. A. Pappone: Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J. Membrane Biol.* 132 (1993) 201–209
- ³⁵ Jones, K. D., G. R. Sharpe: Ni²⁺ blocks the Ca²⁺ influx in human keratinocytes following a rise in extracellular Ca²⁺. *Exp. Cell Res.* 212 (1994) 409–413
- ³⁶ Shreeve, S. M., J. C. Venter: Molecular properties of the voltage-dependent calcium channel. In: *Structure and physiology of the slow inward calcium channel* (ed. J.C. Venter and D. Triggle) (1987), 109–121. Alan Liss, Inc.
- ³⁷ Heinegard, D., A. Oldberg: Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous matrix molecules. *FASEB J.* 3 (1989) 2042–2051
- ³⁸ Kirsch, T., R. E. Wuthier: Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagen. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11462–11469
- ³⁹ von der Mark, K., M. Pfäffle, C. Hofmann, M. Borchert, J. Mollenhauer: Anchorin CII, a collagen binding protein of the calpactin-lipocortin family. In: *Receptors for extracellular matrix* (ed. J. A. McDonald and R. P. Mecham) (1991), pp. 301–323, New York: Academic Press

Herrn Dr. med. J. Flechtenmacher

Orthop. Abtlg. des Rehabilitationskrankenhauses Ulm
Oberer Eselsberg 45
D-89081 Ulm